

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

JEAN-PIERRE CHANGEUX

PREMIÈRE THÈSE :

SUR LES PROPRIÉTÉS ALLOSTÉRIQUES
DE LA L-THRÉONINE DÉSAMINASE
D'*ESCHERICHIA COLI* K 12

DEUXIÈME THÈSE

(PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ) :

DONNÉES RÉCENTES SUR LA
RÉPLICATION DE L'ADN *IN VIVO*

Soutenues le 25 juin 1964 devant la Commission d'examen.

M. MONOD, *Président*

MM. SLONIMSKI, KEPES, *Examineurs*

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

JEAN-PIERRE CHANGEUX

PREMIÈRE THÈSE :

**SUR LES PROPRIÉTÉS ALLOSTÉRIQUES
DE LA L-THRÉONINE DÉSAMINASE
D'*ESCHERICHIA COLI* K 12**

DEUXIÈME THÈSE

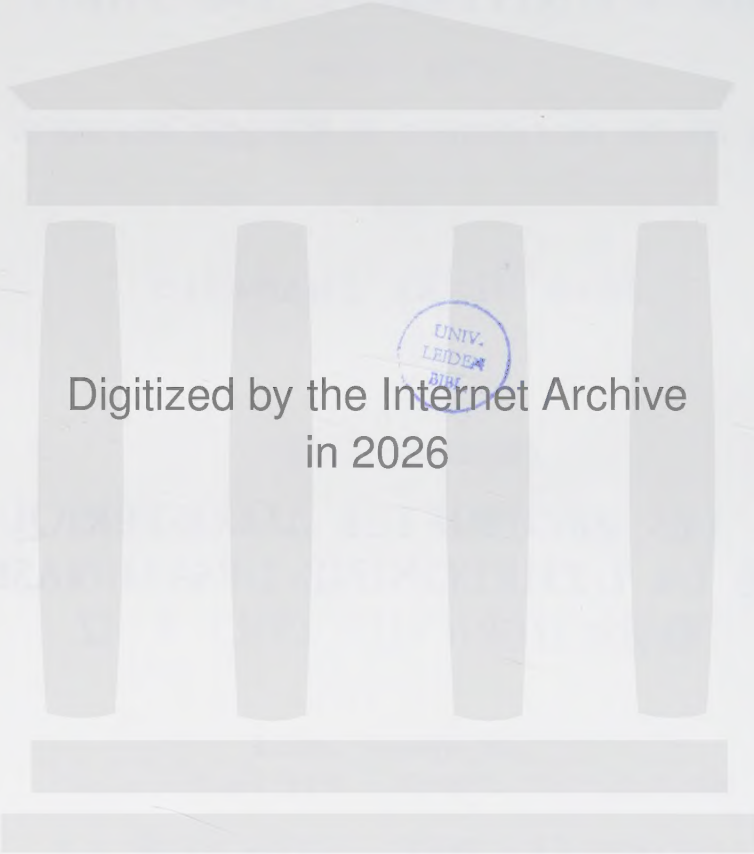
(PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ) :

**DONNÉES RÉCENTES SUR LA
RÉPLICATION DE L'ADN *IN VIVO***

Soutenues le 25 juin 1964 devant la Commission d'examen.

M. MONOD, Président

MM. SLONIMSKI, KEPES , Examinateurs



Digitized by the Internet Archive
in 2026



Janvier 1964.

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

- PROFESSEURS -

Doyen M. ZAMANSKY

BRELOT	T Analyse supérieure.
PRENANT	T Anatomie et Histologie comparée.
GRASSE	T Evolution des êtres organisés.
PREVOST	T Chimie organique.
WYART	T Minéralogie et Cristallographie.
TEISSIER	T Zoologie.
MANGENOT	T Biologie végétale (Orsay).
AUGER	T Physique quantique et Relativité.
MONNIER	T Physiologie générale.
PIVETEAU	T Paléontologie.
ROCARD	T Physique ENS.
CARTAN	T Mathématiques ENS.
LAFFITTE	T Chimie générale.
N...	T Géométrie supérieure.
COULOMB	T Physique du globe.
M ^{lle} COUSIN	T Biologie animale SPCN.
CHRETIEN	T Chimie minérale.
BOCQUET	T Zoologie.
KASTLER	T Physique ENS.
EPHRUSSI	T Génétique.
RIVIERE	T Géologie SPCN et Sédiment (Orsay).
GAUTHERET	T Biologie végétale PCB.
LUCAS (R.).	T Recherches physiques.
THOMAS (A.).	T Biologie cellulaire.
ARNULF	T Optique appliquée.
MORAND	T Physique enseignement.
SOLEILLET	T Physique PCB.
FORTIER	T Mécanique expérimentale des fluides.
DRACH	T Zoologie.
QUENEY	T Météorologie et Dynamique atmosphérique.
GALLIEN	T Embryologie.
EICHORN	T Botanique.
DE CUGNAC	T Biologie végétale SPCN.
M ^{lle} CAUCHOIS	T Chimie physique.
THELLIER	T Physique du globe.
L'HERITIER	T Biologie générale (Orsay).
GRIVET	T Radioélectricité (Orsay).
PONCIN	T Mécanique générale.
DU BREIL	T Arithmétique et Théorie des nombres.
QUELET	T Chimie organique.
CAGNIARD	T Géophysique appliquée.
CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER	T Micropaléontologie.
JUNG	T Géologie.
TRILLAT	T Microscopie et Diffraction électronique.

WIEMANN
JACQUINOT
VASSY
DESTOUCHES
AMIEL
HOCART
J.-P. MATHIEU
COUTEAUX
MAY
CHOQUET
FELDMANN
GUINIER
JOST
FORTET

SCHWARTZ
CHOUARD
MALAVARD
NORMANT
BENARD
BUVAT
DUGUE
SOULAIRAC
ULRICH
MARECHAL
KIRRMANN
CHADEFAUD
M^{lle} Le BRETON
LELONG
DEVILLERS
EHRESMAN
FRANCON
GLANCEAUD
DODEMENT
PISOT
ROCH
SCHATZMANN
TERMIER
ZAMANSKY
LENNUIER
RIZET
ROUTHIER
M^{me} TONNELAT
DIXMIER
SOUCHAY
AIGRAIN
BRUSSET
M. LEVY

M^{me} CHAIX
M^{me} HUREL PY
PANNETIER
BRUN
LEDERER

T Chimie organique et structurale.
T Spectroscopie et Physique céleste (Orsay).
T Physique de l'atmosphère.
T Théorie physique.
T Chimie générale.
T Minéralogie et Cristallographie.
T Physique optique.
T Cytologie.
T Zoologie.
T Théorie des fonctions et Topologie.
T Biologie végétale marine.
T Physique des solides (Orsay).
T Physiologie comparée.
T Calcul des probabilités et Physique mathématique.
T Calcul différentiel et intégral.
T Physiologie végétale.
T Aviation (technique aéronautique).
T Synthèse organique.
T Chimie minérale.
T Botanique ENS.
T Statistiques mathématiques.
T Physiologie.
T Physiologie végétale appliquée.
T Optique théorique et appliquée.
T Théories chimiques.
T Botanique.
T Physiologie de la nutrition.
T Application de l'analyse à la géométrie.
T Anatomie et Histologie comparée.
T Topologie algébrique.
T Physique SPCN.
T Géographie physique et Géologie.
T Mathématiques MGP.
T Technique mathématique de la physique.
T Géologie.
T Astrophysique.
T Géologie générale.
T Mathématiques générales.
T Physique MGP.
T Génétique (Orsay).
T Géologie appliquée.
T Physique théorique.
T Mathématiques MPC.
T Chimie générale.
T Electrotechnique générale.
T Chimie systématique.
T Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
T Chimie biologique.
T Biologie végétale PCB.
T Chimie générale.
T Mécanique des fluides I.
T Chimie biologique (Orsay).

M ^{me} DUBREIL	T Mathématiques (Agrégation).
M ^{me} LELONG	T Mathématiques II ENS.
BELLAIR	T Géologie SPCN.
COTTE	T Physique électricité.
DUBOIS (J.-E.)	T Chimie organique.
LAMOTTE	T Zoologie ENS.
MICHEL (A.)	T Chimie minérale (Orsay).
OLMER	T Energétique générale.
ROUAULT	T Electricité (Orsay).
GAUTHIER	T Mécanique appliquée.
BARCHEWITZ	T Chimie physique.
BROSSEL	T Physique atomique.
BUSER	T Physiologie comparée.
CAMUS	T Physiologie végétale.
CASTAING	T Physique II thermodynamique (Orsay).
CURIEN	T Minéralogie et Cristallographie.
MOYSE	T Physiologie végétale (Orsay).
M ^{me} CHARNIAUD-	
COTTON	T Evolution des êtres organisés.
POSSOMPES	T Zoologie.
PULLMANN	T Chimie quantique.
TEILLAC	T Physique nucléaire et Radioactivité (Orsay).
TONNELAT	T Biophysicochimie (Orsay).
VILLE	T Econométrie.
WILLEMART	T Chimie PCB.
DODE	T Chimie (Orsay).
FREYMANN	T Recherches physiques.
GUINOCHET	T Biologie végétale SPCN (Orsay).
ROLLET	T Chimie minérale.
M ^{lle} JOSIEN	T Chimie SPCN.
CHEVALLEY	T Géométrie algébrique et théorie des groupes.
ARNOULT	T Electronique (Orsay).
CHAPELLE	T Physique I (Orsay).
DELANGE	T Mathématiques I (Orsay).
DENY	T Mathématiques générales (Orsay).
GERMAIN	T Mécanique théorique des fluides.
LUCAS	T Géologie.
ALLARD	T Chimie physique.
BERTHELOT	T Physique des particules fondamentales (Orsay).
BRICARD	T Météorologie et Physique de l'atmosphère.
M ^{me} ALBE-FESSARD	T Psycho-physiologie.
FRIEDEL	T Physique des solides (Orsay).
JULIA (M.)	T Structures moléculaires complexes.
LENDER	T Biologie animale SPCN (Orsay).
MAGAT	T Physicochimie des radio-éléments.
M ^{lle} QUINTIN	T Electrochimie.
MONOD	T Chimie du métabolisme.
BENOIT	T Physiologie animale (Orsay).
DE POSEEL	T Analyse numérique.
CHARLOT	T Chimie analytique.
LEMEE	T Ecologie végétale (Orsay).
GUERIN	T Chimie MPC (Orsay).
CHATELET	T Chimie PCB.
JEAN	T Physiologie nucléaire (Orsay).

MATTLER	Physique SPCN.
BERGERARD	T Zoologie (Orsay).
BERTEIN	T Electronique (Orsay).
BOUSSIÈRES	T Radiochimie.
M ^{me} COUTURE	T Thermodynamique et mécanique physique.
ELLEMBERGER	T Géologie des grandes régions du globe (Orsay).
FRANC	T Biologie animale PCB.
SCHNELL	Botanique tropicale.
STLKOWSKI	T Physiologie végétale.
ACHER	T Chimie biologique.
BAUDOIN	T Biologie animale PCB.
BEAUMONT	Biologie animale SPCN.
BLAMONT	Géophysique ionosphère.
BOUREAU	T Botanique.
CURIE (D.)	Physique MGP.
DURAND DELGA	T Géologie.
FREON	T Chimie organique (Orsay).
HELLER	T Physiologie végétale.
TORTRAT	T Calcul des probabilités.
CAILLEUX	T Géologie SPCN.
MAGNAN	Physique électricité.
DAUDEL	T Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physiologie nucléaire.
M ^{lle} FOURCROY	Biologie végétale SPCN.
M ^{me} CHOQUET- BRUHAT	Mécanique analytique et mécanique céleste.
M ^{lle} VEIL	T Physiologie générale.
LWOFF	T Microbiologie.
SIESTRUNCK	T Mécanique physique et expérimentale.
LACOMBE	T Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay).
BROCHARD	T Physique PCB (Orsay).
CABANNES	T Mécanique générale.
LESIEUR	T Mathématiques I (Orsay).
MAZET	T Mécanique générale (Orsay).
CAIRE	Géographie physique et Géographie dyna- mique.
COMOLET	Mécanique des fluides.
CORABCEUF	T Physiologie animale (Orsay).
DELLOUE	T Physique de l'exosphère.
GORENFLOT	Botanique II (Orsay).
HOUILLOIN	Biologie animale PCB.
JULLIEN (J.)	Chimie SPCN (Orsay).
MALGRANGE	T Technique mathématique de la physique (Orsay).
OLIVIER	Anthropologie.
NOZERAN	T Botanique II (Orsay).
BLANC-LAPIERRE	T Physique ENS (Orsay).
CHEVAUGEON	T Botanique (Orsay).
KAHANE	T Mathématiques (Orsay).
SAMUEL	T Mathématiques ENS féminines.
KOURGANOFF	T Astronomie (Orsay).
THIRY	T Mécanique céleste.
ABELES	Physique SPCN.
AMAT	T Physique PCB.

AUBOIN
M^{me} BENOIT-

T Géologie.

GUEUTAL

T Physique nucléaire et Radioactivité (Orsay).
Biologie marine (Villefranche-sur-Mer).

BOUGIS

T Mathématiques MPC.

BRUHAT

T Géologie historique (Orsay).

BRUNN

T Physique MGP (Orsay).

CHABRAL

T Mathématiques propédeutiques.

DEHEUVELS

T Physique théorique (Orsay).

D'ESPAGNAT

T Géologie SPCN.

FURON

T Génétique.

M^{me} GANS

Biologie végétale PCB.

GENEVES

Physique CUS (Orléans).

GUILBERT

T Pétrographie.

HUPE

T Biologie générale.

HOLLANDE

T Analyse numérique.

LIONS

T Chimie PCB.

MAITTE

Physique propédeutique.

MEYER

Géologie appliquée.

NICOLAS

Biologie générale.

PANIGEL

Pétrographie.

RAVIER

T Mécanique théorique des fluides.

ROSEAU

Electronique.

ROUBINE

T Chimie PCB.

SILBER

T Electronique.

UEBERSFELD

T Théories physiques.

YVON

T Mathématiques.

HERVE

T Mathématiques MPC (Orsay).

NERON

M^{me} PECKER-

WIMEL

T Astrophysique.

BALKANSKY

Physique MPC.

LE CORRE

T Electricité.

DELCROIX

T Physique théorique (Orsay).

GOURDIN

Physique théorique des hautes énergies
(Orsay).

LEHMANN

T Physique expérimentale des hautes énergies.

NATAF

T Physique nucléaire et Radioactivité (Orsay).

ECHALIER

Biologie animale PCB.

BARRAUD

Physiologie cellulaire.

LIORET

Physiologie végétale (Orsay).

DARS

Géologie structurale et Géologie appliquée.

CAMEFORT

T Botanique (Agrégation).

VICHNIEWSKY

T Mécanique industrielle.

BLAQUIERE

T Electronique (Orsay).

ARNOUS

T Physique théorique.

TATIBOUET

Physique théorique.

MALLIAVIN

T Chimie (CSU, Orléans).

GAUDEMAR

Mathématiques propédeutiques (Orsay).

PEREZ Y JORBA

Physique expérimentale des hautes énergies
(Orsay).

DAVID

T Chimie (Agrégation, Orsay).

BROUSSE

T Mécanique théorique.

ROSCH

T Astronomie.

GUY

T Physique expérimentale.

LAZARD	Mathématiques MPC.
MOREL (Pierre)	Physique MPC.
ARSAC	Programmation.
LEFEBVRE	Chimie MPC.
CHAPEVILLE	Biochimie.
BENOIT	Physique CPEM.
RIO	Chimie CPEM.
JAUZEIN	Géologie ENS.
PREVOST (Georges)	BV CPEM.
FAVARD (P.)	BA CPEM.
VILKAS	Chimie CPEM.
M ^{lle} FICINI	Chimie CPEM.
LEQUEUX	Astronomie.
COHEN TANNOUDJI	Physique MPC.
TAVERNIER	Physique CPEM.
M ^{me} ROIZEN	Physique CPEM.
DURAND (M.)	BA SPCN.
PASCAUD	Physiologie.
M ^{me} PETIT	BA CPEM.
BROUSSE	Géologie (Orsay).
CAGNIAC	Physique agrégation (Orsay).
LEBERRE	Zoologie (Orsay).
SCHEFFER	Microbiologie (Orsay).
DE GENNES	Physique des solides (Orsay).
RIOU	Physique nucléaire expérimentale (Orsay).
CLAUSER	Chimie biologique (Orsay).
CHEVALIER	Physiologie animale (Orsay).
JANCOVICI	Physique atomique (Orsay).
FALK-VAIRANT	Physique nucléaire (Orsay).
FETIZON	Chimie propédeutique (Orsay).
CERF	Mathématiques (Orsay).

Le Secrétaire général : R. POULAIN

SUR LES PROPRIÉTÉS ALLOSTÉRIQUES DE LA L-THRÉONINE-DÉSAMINASE.

I. — MÉTHODES D'ÉTUDE DE LA L-THRÉONINE DÉSAMINASE DE BIOSYNTHÈSE,

par Jean-Pierre CHANGEUX.

Institut Pasteur, Service de Biochimie cellulaire.

(Mémoire reçu le 10 juin 1964).

INTRODUCTION.

Les êtres vivants ne sont pas seulement des machines chimiques, ce sont aussi des machines bien réglées. Si les fonctions développées par les êtres vivants se réduisent, en dernière analyse, à des mécanismes moléculaires, les processus de régulation dont ils sont l'objet doivent pouvoir être définis, eux aussi, en termes moléculaires.

L'étude des mécanismes régulateurs de la cellule, qui s'est développée surtout à partir des microorganismes, a révélé précisément l'existence d'un réseau d'interactions moléculaires spécifiques qui servent à régler et coordonner le fonctionnement des diverses voies du métabolisme. Deux types de structures chimiques interviennent : des métabolites qui gouvernent une réaction chimique sans pour cela y participer et jouent ainsi le rôle de *signaux physiologiques* ; des protéines réceptrices ou protéines « *allostériques* » (MONOD et JACOB [1], MONOD et al. [2]) qui reconnaissent spécifiquement les signaux physiologiques et au niveau desquelles s'effectue l'interaction régulatrice primaire.

Les systèmes les plus simples sont évidemment ceux pour lesquels l'interaction régulatrice primaire s'effectue au niveau d'une molécule d'enzyme : l'activité biologique de la protéine réceptrice est une *activité enzymatique*. C'est le cas par exemple chez les bactéries des premiers enzymes spécifiques des chaînes de biosynthèse dont l'activité est spécifiquement inhibée par le produit final de la chaîne (NOVICK et SZILARD [3] ; UMBARGER [4] ; YATES et PARDEE [5]).

Beaucoup plus difficiles d'accès sont les systèmes pour lesquels la régulation porte sur une chaîne complexe d'événements menant à la *synthèse* d'enzymes spécifiques (phénomènes d'induction ou de répression). Il est clair néanmoins que dans tous les cas connus cette régulation s'opère au niveau génétique (JACOB et MONOD [6]).

Le propos de notre travail était, à l'origine, d'étudier l'un et l'autre des mécanismes qui règlent la biosynthèse de la L-isoleucine chez *E. coli* K 12. Outre l'intérêt général que cette voie métabolique offre en tant que voie de biosynthèse d'un métabolite essentiel du colibacille, celle-ci présente plusieurs singularités que UMBARGER et ses collaborateurs ont clairement mises en évidence. Reportons-nous au Tableau I sur lequel sont figurées les réactions menant à la synthèse de la L-isoleucine et de quelques acides aminés ayant une parenté structurale avec elle. Il est remarquable que :

1) le substrat de la première réaction spécifique de la synthèse de la L-isoleucine est un acide aminé, la L-thréonine, qui, comme la L-isoleucine, est incorporé dans les protéines bactériennes ;

2) de tous les enzymes intervenant dans la synthèse de la L-isoleucine, le seul enzyme qui participe intégralement à cette synthèse est le premier de la chaîne : la L-thréonine désaminase. En effet les enzymes suivants effectuent simultanément les réactions de synthèse de la L-isoleucine et de la L-valine (RUDMAN et MEISTER [7], ADELBERG et UMBARGER [8], MYERS et ADELBERG [9]. Par surcroît le précurseur immédiat de la L-valine, l' α -cétobutyrate sert aussi de précurseur à deux métabolites essentiels : la L-leucine (STRASSMAN, LOCKE, THOMAS et WEINHOUSE [10] et l'acide pantothénique (KUHN et WIELAND [11] et voir MAAS [12]). Les voies métaboliques de biosynthèse menant à ces deux composés se trouvent donc branchées sur la chaîne de synthèse de la valine, elle-même commune dans sa plus grande longueur avec la chaîne de synthèse de la L-isoleucine.

La disposition de ces voies de biosynthèse laissait prévoir non seulement des systèmes de régulation individuels pour chaque séquence spécifique, mais aussi des systèmes d'interaction entre chacune de ces chaînes.

On doit à UMBARGER et à ses collaborateurs d'avoir démontré la première de ces prédictions : la L-isoleucine inhibe *in vitro* l'activité de la L-thréonine désaminase (UMBARGER [4]), la L-valine contrôle l'activité de l'acétolactate synthétase (UMBARGER et BROWN [13]), la L-leucine la β -carboxy β -hydroxy isocaproate synthétase (UMBARGER comm. pers.).

D'autre part, il a pu être mis en évidence une action de la L-valine dans la régulation de la synthèse de la L-isoleucine : la L-valine antagonise *in vitro* l'inhibition de la L-thréonine désaminase par la L-isoleucine (CHANGEUX [14]) ; et la L-valine coopère avec la L-isoleucine, la L-leucine et le pantothénate à la répression de la L-thréonine désaminase et de plusieurs enzymes suivants (« répression multivalente »). FREUNDLICH et al. [15] et UMBARGER comm. pers.).

Devant le nombre et la complexité des phénomènes intéressant la régulation de ces chaînes de biosynthèse, nous avons choisi de nous consacrer à l'analyse de l'interaction régulatrice élémentaire décou-

verte par UMBARGER par laquelle la L-isoleucine inhibe l'activité de la L-thréonine désaminase, excluant du cadre de ce travail tout ce qui concerne le contrôle de la biosynthèse des divers enzymes de ces chaînes et en particulier le phénomène de « répression multivalente ».

Toutefois avant d'aborder l'étude des propriétés de la L-thréonine désaminase il n'est peut-être pas inutile, pour ne plus y revenir, de nous attarder un peu sur la comparaison des deux mécanismes de régulation dont cet enzyme est l'objet.

Une excellente preuve de la distinction du mécanisme d'inhibition de l'activité d'un enzyme et du mécanisme de répression peut nous être fournie par l'analyse du *déterminisme génétique* de chacun de ces deux mécanismes.

C'est ainsi que dans la collection des souches que nous avons rassemblée au cours de cette étude il en est une qui synthétise 10 à 15 fois plus de L-thréonine désaminase que la souche sauvage (cf. p. [5] et CHANGEUX [16]). Cette souche, qui a perdu le contrôle par répression, est vraisemblablement mutée sur un gène dit « régulateur » (JACOB et MONOD [18]) dont la localisation chromosomique a été faite (CHANGEUX 1961 et non publié). Cette mutation est située au voisinage

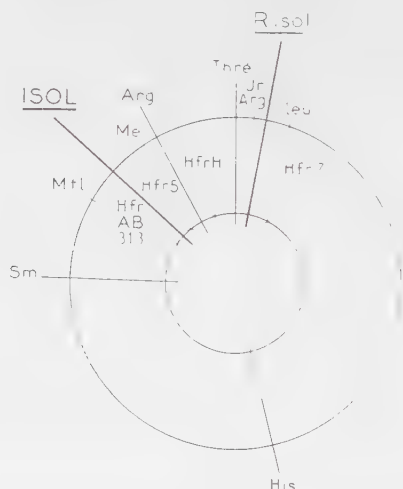


FIG. 1. — Représentation schématique des déterminants génétiques impliqués dans le contrôle de la biosynthèse de la L-isoleucine chez *E. coli* K 12.

Pour la localisation des marqueurs *Isol* et *R isol* et leur identification respective au gène de structure de la L-thréonine désaminase de biosynthèse et au gène de régulation qui gouverne la synthèse de la L-thréonine désaminase se référer au texte art. n° IV. Pour les autres marqueurs se référer aux travaux de JACOB et WOLLMAN [17]. Les flèches indiquent la polarité du transfert et l'origine des segments chromosomiques transférés par les différentes souches Hfr utilisées (voir texte art. n° IV).

Abréviations : *Arg* : Arginine ; *Leu* : Leucine ; *Me* : Méthionine ; *Mtl* : Mannitol ; *Sm* : Streptomycine ; *Ur-Arg* : Uracile-Arginine.

du marqueur *Lac* de la carte chromosomique établie par JACOB et WOLLMAN ([17] et résultats non publiés), entre le marqueur *Leu* et le marqueur *Ur Arg* (fig. 1); elle est donc fort éloignée du marqueur *Isol* de la même carte, marqueur qui a pu être identifié au « gène de structure » (JACOB et MONOD [18]) de la L-thréonine désaminase. Or, nous verrons plus loin (Art. IV) que les déterminants des propriétés régulatrices de la L-thréonine désaminase sont précisément contenus dans son gène de structure.

Des structures génétiques différentes sont donc mises en œuvre par le contrôle par répression et par le contrôle par inhibition d'activité.

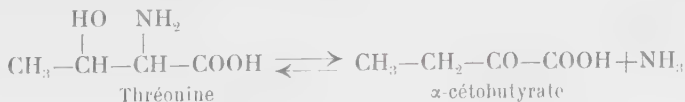
Malgré ces différences essentielles l'un et l'autre de ces mécanismes sont en définitive gouvernés par des métabolites jouant le rôle de signaux spécifiques et mettent en œuvre l'un comme l'autre, en toute vraisemblance, des protéines allostériques responsables de leur reconnaissance et de leur transmission. Les molécules des « répresseurs » spécifiques qui règlent les activités géniques sont, pour l'instant, d'une approche difficile. Par contre, les enzymes de contrôle, du type de la L-thréonine désaminase, offrent un matériel de choix pour l'analyse d'une interaction régulatrice élémentaire.

PARTIE EXPÉRIMENTALE.

Nous discuterons, dans ce premier article, les conditions dans lesquelles ont été effectuées les expériences et les techniques employées. Seront présentées successivement : les caractères généraux de la réaction étudiée, les souches bactériennes utilisées pour l'extraction de l'enzyme, les procédés d'extraction et de dosage, les propriétés de stabilité de la molécule et enfin la méthode de fractionnement qui a permis d'aboutir à une préparation de l'enzyme suffisamment pure pour le besoin des méthodes employées.

I. — CARACTÈRES GÉNÉRAUX DE LA RÉACTION DE DÉSAMINATION DE LA THRÉONINE.

La réaction étudiée a lieu aussi bien en présence d'oxygène qu'en son absence ; fondamentalement différente des réactions de désamination oxydative elle s'écrit :



Thréonine désaminase.

Le phosphate de pyridoxal participe directement à la réaction en établissant des liaisons covalentes avec le substrat.

L'étape initiale de la liaison de la thréonine avec le phosphate de pyridoxal serait constituée, d'après BRAUNSTEIN et SHEMYAKIN [20] ou METZLER, IKAWA et SNELL [21], par la formation d'une base de Schiff avec perte d'une molécule d'eau. La base de Schiff formée serait hydrolysée par la suite. La nature de cette première étape justifie l'appellation de « thréonine déshydrase » (*) parfois réservée à l'enzyme.

Nous conserverons dans l'exposé qui va suivre la nomenclature la plus utilisée qui se trouve être la nomenclature originale et continuerons d'appeler thréonine désaminase tout système enzymatique catalysant la transformation de la thréonine en α -cétobutyrate.

Dans les extraits bruts d'*Escherichia coli* existent trois enzymes spécifiques et distincts effectuant la transformation des isomères D ou L de la thréonine en acide α -cétobutyrique. Ces enzymes peuvent être séparés en variant les conditions de culture des bactéries utilisées pour préparer les extraits (UMBARGER et BROWN [22 et 23]). En milieu complet contenant tryptone et extrait de levure et en anaérobiose, *E. coli* synthétise une thréonine désaminase spécifique de l'isomère L, particulièrement stable et qui possède la remarquable propriété d'être activée par l'acide adénylique et le glutathion. Cette « *L-thréonine désaminase de dégradation* » n'apparaît pas en présence de glucose ou en milieu aéré et n'a rien à voir, semble-t-il, avec la biosynthèse de la L-isoleucine ; elle interviendrait selon UMBARGER et BROWN [22] dans le métabolisme énergétique de la cellule. Un autre système enzymatique, spécifique de la désamination de l'isomère D de la thréonine, existe aussi chez *E. coli*, la présence de glucose dans le milieu de culture n'affecterait pas sa synthèse. La « *D-thréonine désaminase* » permettrait aux souches d'*E. coli* exigeantes en isoleucine de croître en présence de D-thréonine (UMBARGER et BROWN [22]). Mais la D-thréonine n'est pas un acide aminé naturel (**), ce système ne semble donc être qu'exceptionnellement utilisé dans la biosynthèse de la L-isoleucine. C'est un troisième enzyme spécifique de la L-thréonine, la « *L-thréonine désaminase de biosynthèse* » qui se trouve impliqué directement dans la biosynthèse de la L-isoleucine et en effectue la première réaction spécifique. Cet enzyme est seul synthétisé dans les cellules croissant en milieu minimum avec le glucose comme source de carbone ; son inactivation par mutation crée toujours une exigence en L-isoleucine (UMBARGER [24, 25] et UMBARGER et BROWN [22]) ; et, nous le savons, la L-isoleucine en commande l'activité et le taux de synthèse. Au cours de ce travail il ne sera fait référence qu'à ce système enzymatique et les conditions de préparation des extraits (cf. p. 933) ont toujours été telles que lui seul soit présent.

(*) En fait son nom systématique dans le « Report of the Commission on Enzymes » de 1961 sous le numéro 4.2.1.15 est « *thréonine hydro-lyase* (désaminante) ».

(**) Le seul substrat naturel de l'enzyme est la D-sérine.

II. — LES SOUCHES BACTÉRIENNES.

a) *Nomenclature des souches.*

Les clones utilisées pour la production de L-thréonine désaminase dérivent, sauf exception, de la souche d'*Escherichia coli* K 12 HfrH (HAYES [25]). Le plus souvent les extraits ont été préparés à partir d'un mutant Hfr H R⁻ (isol) dérèprimé pour la L-thréonine désaminase. Les conditions dans lesquelles ce mutant a été isolé sont les suivantes : des cellules de la souche sauvage d'*Escherichia coli* K 12 HfrH après avoir été exposées au rayonnement ultraviolet sont étalées sur une boîte de milieu synthétique gélosé contenant du glucose additionné de L-isoleucine (5×10^{-2} M). La souche sauvage ne se multiplie pas sur ces boîtes et parmi les colonies qui apparaissent peuvent être purifiés des clones excréant de l'isoleucine dans le milieu de culture et dont le niveau de L-thréonine désaminase est 10 à 15 fois plus élevé que celui de la souche parentale. Le taux élevé de réversion du mutant HfrHR⁻ (isol) nécessite un réisolement sur milieu sélectif avant chaque culture massive.

Les expériences de génétique bactérienne ont mis en œuvre les souches à haute fréquence de recombinaison suivantes : HfrH (HAYES [25]), Hfr 5 et 7 (JACOB et WOLLMAN [26]), Hfr AB 313 (= AT 13) (TAYLOR et ADELBERG [27]) et les souches de type sexuel F⁻ : C 600 Sr, P 1340 (WOLLMAN et JACOB [28] et résultats non publiés). Les caractéristiques de chaque souche seront précisées au cours de la description des protocoles expérimentaux.

Occasionnellement quelques préparations d'enzyme ont été effectuées à partir des espèces bactériennes suivantes : *Salmonella typhimurium* souche mutator n° 119 (DEMEREČ non publié), *Serratia marcescens* 1518 (Stannier) et *Aerobacter aerogenes* souche L III₁ (Le Minor) appartenant comme *E. coli* à la famille des Enterobacteriaceae (Eubactériales).

Enfin dans quelques expériences il a été fait appel à un organisme, très différent des précédents, de la famille des *Athiorhodaceae* (Pseudomonadales) : *Rhodospirillum rubrum*, souche S₁, isolée par VAN NIEL (cette souche nous a été obligeamment transmise par H. GEST).

b) *Milieux de culture.*

α) *Culture en milieu liquide.*

Les cultures d'*Escherichia coli* et des diverses *Enterobacteriaceae* utilisées ont été effectuées en milieu minéral synthétique n° 63 contenant :

KPO ₄ H ₂	: 13,6	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	: 0,2	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	: 2	g
FeSO ₄ .7H ₂ O	: 0,005	g
eau bidistillée	qsp 1000	ml

et ajusté à $\text{pH} = 7,2$ avec KOH. Afin de réprimer la L-thréonine désaminase de dégradation, la source de carbone organique a toujours été le glucose à la concentration de 3 g/l environ. De la thiamine, exigence spécifique de la souche Hfr H, a été incorporée au milieu à des concentrations voisines de 1 pg/ml. Les cultures ont été aérées par agitation à 37° C.

La souche S_1 de *Rhodospirillum rubrum* a été cultivée soit en aérobiose à l'obscurité et en milieu riche (bouillon contenant extrait de viande Liebig 5 g; peptone bactériologique 10 g; NaCl 5 g; H_2O qsp 1000 ml, pH 7,4 avec KOH), soit en anaérobiose, à la lumière artificielle et en milieu minimum dans les conditions décrites par ORMEROD et al. [29], c'est-à-dire en milieu minéral additionné de DL-malate 6 g, de DL-glutamate 1 g et de biotine 15 μg par litre de milieu.

La température des cultures était maintenue à 27° C.

β) Cultures sur milieu solide.

Le milieu minéral synthétique de culture d'*E. coli* contient les éléments du milieu liquide n° 63 additionnés de 15 g de gélose Difco-agar par litre. Le milieu complet est préparé à partir de bouillon solidifié par de la gélose à raison de 20 g par litre.

c) Techniques génétiques.

a) Mutagénèse.

Quelques mutants spontanés ont été récoltés mais le plus souvent l'apparition de ceux-ci a été provoquée par l'exposition des cellules au rayonnement ultraviolet, à l'acide nitreux (KAUDEVITZ [30]) ou à l'éthyl méthane sulfonate (EMS) suivant la méthode décrite par YANOFSKY [31]. Les mutants auxotrophes ont été sélectionnés en présence de pénicilline suivant la technique de DAVIS [32].

β) Croisements.

Les croisements entre bactéries Hfr (environ 5×10^7 bactéries/ml) et F^- (10^8 à 4×10^8 bactéries/ml) issues de cultures en phase exponentielle ont été effectués en milieu complet, à 37° C avec une faible agitation. Les prélèvements après dilution, si nécessaire, sont mélangés à quelques millilitres de milieu 63 et étalés en nappe sur le milieu solide adéquat.

III. — PRODUITS CHIMIQUES.

Acides aminés et dérivés.

L-thréonine (California: Agracide)	L-thréonine amide HCl (Cyclo)
L-thréonine méthylester HCl (Cyclo)	D-thréonine (Light et California)
DL-allothrénine (NBC)	L-allothrénine (NBC)
L-sérine (NBC et Sigma)	D-sérine (Sigma)
O-méthyl DL-sérine (Cyclo)	O-benzyl L-sérine (Cyclo)

DL- β phényl sérine (Cyclo)	L-homosérine (Cyclo)
DL-homosérine (Sigma)	L- α aminobutyrique (California)
L-norvaline (Sigma)	L-norleucine (Sigma)
L-leucine (Hoffmann-La Roche)	L-isoleucine (California : A grade, Allofree)
L-isoleucine amide HCl (Cyclo)	L-isoleucine méthylester HCl (Cyclo)
N-acétyl L-isoleucine (Cyclo)	N-chloracétyl L-isoleucine (Sigma)
N-chloracétyl DL-isoleucine (NBC)	L-isoleucine hydantoïne (Cyclo)
DL-isoleucamine HCl (Calif.)	D-isoleucine (Mann)
DL-alloisoleucine (Light)	D-alloisoleucine (Light)
L-valine (California : A grade)	L-valine HCl (Cyclo)
L-valine méthylester HCl (Cyclo)	N-acétyl L-valine (Cyclo)
N-chloracétyl L-valine (Cyclo)	DL-isovaline (Light)
L-pénicillamine HCl (California)	DL-méthallylglycine (gracieusement offert par Dittmer)
DL-crotylglycine (gracieusement offert par Dittmer)	pyruvate de sodium (Hoffmann-La Roche)
acide α -cétobutyrique (Sigma)	α -cétovallérate de sodium (Sigma)
DL- α hydroxy- β -méthyl valérate de sodium (Sigma)	dihydroxyisovalérate de sodium (gracieusement offert par Adelberg)
dihydroxyméthyl valérate de sodium (gracieusement offert par ADELBERG).	3-fluoro tyrosine (Light)

Les autres acides aminés et analogues employés au cours de ce travail et non cités dans cette liste proviennent des laboratoires Hoffmann-La Roche.

Phosphate de pyridoxal (Hoffmann-La Roche).

Autres produits organiques et produits minéraux :

2-4 dinitrophényl hydrazine (Prolabo), magnésium titriplex (Merck), les autres produits proviennent des laboratoires Prolabo.

IV. — TECHNIQUES D'EXTRACTION ET DE DOSAGE DE LA L-THRÉONINE DÉSAMINASE DE BIOSYNTHÈSE.

a) *Extraction*

Les bactéries récoltées en phase exponentielle par centrifugation ont toujours été lavées au milieu synthétique 63 avant d'être resuspendues dans une solution molaire de phosphate de potassium tamponnée à pH 8.0 ± 0.1 et additionnée ou non de L-isoleucine 10^{-3} M et de magnésium titriplex 10^{-3} M, à une concentration finale le plus

souvent voisine de 20 mg, poids sec, de bactéries par millilitre. Parmi les divers procédés d'extraction essayés : broyage à l'alumine, broyage par des billes de verre, poudre acétonique, traitement par les ultra-sons, le dernier d'entre eux s'est révélé être le plus efficace. Le rendement maximum d'extraction est obtenu après une durée d'exposition de 20 mn aux vibrations soniques à haute fréquence dans un oscillateur Raythéon 10 KC, la température étant maintenue voisine de 0°C. Ce temps d'exposition a pu être abrégé de dix minutes en congelant au préalable la suspension bactérienne. Pour les volumes de suspension inférieurs à 5 ml, l'oscillateur Mullard a fourni d'excellents résultats et le démasquage maximum de l'activité enzymatique est atteint en moins de trois minutes. Les extraits centrifugés se conservent plusieurs années à -15°C sans perte décelable d'activité enzymatique.

b) *Dialyse.*

Les premières dialyses ont été effectuées en sacs de cellophane en présence de concentrations élevées de phosphate de potassium (1 M) et de protecteurs variés. Par la suite le procédé d'ultrafiltration sur colonnes de Sephadex (G 25) a été utilisé systématiquement. Après lavages et décantations répétés les billes de Séphadex sont équilibrées avec du phosphate de potassium (1 M, pH 8,0) et tassées dans une colonne. La préparation d'enzyme, soigneusement centrifugée, est ajoutée au sommet de la colonne à raison de 1 ml par 10 ml de colonne. Après passage d'un volume de liquide équivalent au volume d'extrait ajouté, le sommet de la colonne de Séphadex affleure, et le tampon ayant servi à l'équilibration initiale est alors ajouté lentement. Parmi les fractions collectées celles qui contiennent l'activité désaminasique sont rassemblées.

c) *Dosage.*

D'une manière générale la réaction de transformation de la L thréonine en α -cétobutyrate a été effectuée en présence de phosphate de potassium 0,2 M tamponnée à pH 8.0 ± 0.1 , de phosphate de pyridoxal à raison de 10 μg /ml et de L-thréonine 2×10^{-2} M tamponnée à pH 8.0. Les tubes à essais contenant le mélange ci-dessus sont incubés cinq minutes dans un bain thermostaté à 27°C, puis l'extrait actif convenablement dilué en phosphate de potassium 1 M tamponné à pH 8.0 est additionné au contenu des tubes en quantité telle que la concentration finale en phosphate soit exactement 0,2 M et le volume total 1,0 ml. Pour chaque détermination d'activité au moins deux tubes sont incubés, l'un cinq minutes, l'autre dix minutes. La réaction est arrêtée par l'addition de 0,1 ml d'une solution d'acide trichloracétique (50 g pour 100 ml). Dans plusieurs séries d'expériences les conditions d'essais de la L-thréonine désaminase ont été modifiées ; les modifications introduites seront précisées chaque fois, soit dans le texte, soit dans la légende de la figure d'accompagnement.

— *Titration de l' α -cétobutyrate.*

Après l'arrêt de la réaction la quantité d' α -cétobutyrate produit est déterminée par la méthode de FRIEDMANN et HAUGEN [33]. Cette méthode colorimétrique s'applique à tous les acides α -cétoniques ; elle est fondée sur la propriété du groupement cétonique de réagir avec la 2-4 dinitrophényl-hydrazine en milieu acide pour donner l'hydrazone correspondante.

Celle-ci est colorée en milieu alcalin et peut alors être titrée par spectrophotométrie. La solution de 2-4 dinitrophényl-hydrazine est préparée en broyant dans un mortier 100 mg de poudre d'hydrazine en présence d'acide chlorhydrique 2 N ; le volume total est progressivement amené à 100 ml. La solution filtrée sur papier se conserve plusieurs jours à la température ordinaire sans s'altérer.

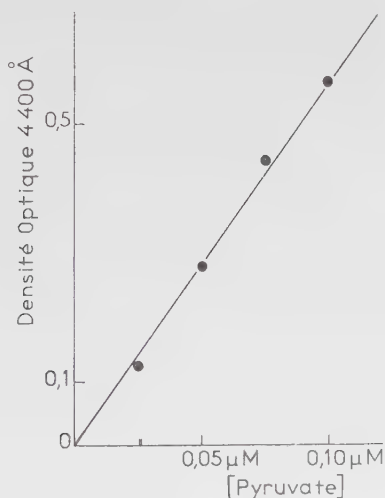


FIG. 2. — *Courbe de titration du pyruvate suivant la méthode de FRIEDMANN et HAUGEN [33] modifiée.*

Description de la méthode de titration dans le texte p. 937.

Aux 1,1 ml du mélange réactionnel contenant de l'acide α -cétobutyrique sont ajoutés et soigneusement mélangés 0,4 ml de la solution hydrazine. Au cours de ces manipulations un précipité de protéines dénaturées provenant de l'extrait bactérien peut apparaître ; s'il n'est pas trop abondant il se redissout entièrement au cours de l'étape suivante et cela ne nuit pas à la précision des mesures. Dix minutes sont nécessaires pour que, à la température du laboratoire, tout l'acide cétonique présent soit transformé en hydrazone ; celle-ci est stable et les tubes peuvent alors être conservés plusieurs heures à la température ambiante. Cinq minutes avant la lecture au spectrophotomètre (Beck-

man et Zeiss) 1,5 ml de soude 2,5 N sont ajoutés aux 1,5 ml de solution d'hydrazone et soigneusement mélangés. La densité optique de la coloration brune obtenue est mesurée au maximum d'absorption : 4400 Å avec comme solution de référence le même mélange mais sans acide cétonique. Dans ces conditions les variations de densité optiques mesurées sont proportionnelles aux variations de concentrations en acide cétonique (Fig. 2). Afin d'étalonner la méthode, des solutions standard d'acides cétoniques ont été préparées à partir de pyruvate de sodium (Hoffman - Laroche) et d' α -cétovallérate de sodium (Sigma) mais non d'acide α -cétobutyrique ; en effet, les impuretés présentes dans le produit commercial et la forme sous laquelle celui-ci se présente ne permettent pas la standardisation rigoureuse des solutions. Les différences observées entre les courbes d'étalonnage, parfaitement linéaires,

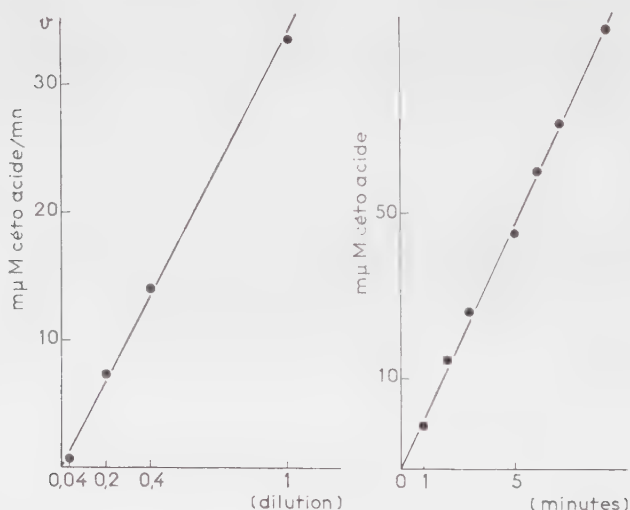


FIG. 3. — Dosage de la *L*-thréonine désaminase de biosynthèse.

Graphique de droite :

Pendant le dosage la quantité d' α -cétobutyrique produit est proportionnelle au temps d'incubation.

Graphique de gauche :

Les vitesses initiales sont proportionnelles aux concentrations d'enzyme.

Conditions générales de dosage décrites dans le texte p. 936 ; 30 μ g/ml en protéines d'un extrait brut dialysé d'une souche dérégulée pour la *L*-thréonine désaminase (figure de droite) ; 96 μ g/ml du même extrait pour la dilution 1 (figure de gauche).

du pyruvate et de l' α -cétovallérate ont toujours été trouvées négligeables devant la précision des lectures au spectrophotomètre, ce qui nous autorise à confondre les coefficients d'extinction à 4400 Å des 2-4 dinitrophenyl hydrazones des pyruvate, α -cétobutyrate et α -cétovallé-

rate. C'est ainsi que, à une densité optique de 1,0 du mélange final de 3 ml, nous avons fait correspondre une concentration d'acide α -cétonique de $0,178 \mu M$ présente dans 1,0 ml de mélange initial.

Les activités enzymatiques ont toujours été exprimées en millimicroles d'acide α -cétonique libéré par minute.

— *Validité de la méthode de dosage.*

En suivant la technique décrite, à condition toutefois que les densités optiques mesurées soient inférieures à 1,5, les écarts par rapport à la moyenne dans une série de mesures répétées ne dépassent pas 2 p. 100.

La vitesse de la réaction de désamination mesurée en présence d'une concentration donnée d'enzyme et de substrat et dans un intervalle de temps ne dépassant pas trente minutes a toujours été trouvée constante (Fig. 3). Les vitesses initiales sont alors rigoureusement proportionnelles aux concentrations d'enzyme présent dans le milieu d'essais (Fig. 3).

V. — STABILITÉ DE LA L-THRÉONINE DÉSAMINASE.

a) *Effets des sels.*

La propriété la plus singulière de la L-thréonine désaminase est son extrême instabilité aux faibles concentrations salines. Ainsi en présence de phosphate de K $M/10$ à $27^\circ C$ et à pH 8,1, la demi-vie de l'enzyme est de trois minutes alors qu'en présence de concentrations de ce sel dix fois plus élevées, elle est accrue jusqu'à plusieurs heures. Parmi les divers sels essayés, les phosphates et citrates alcalins se sont révélés être les plus efficaces stabilisateurs (Tableau II). Les molécules polyhydroxyliques comme le glucose ou le glycérol sont sans effet. Il semble donc que le degré de protection de l'activité dépende de la force ionique du milieu.

Cette propriété remarquable de la L-thréonine désaminase de biosynthèse n'est pas particulière à l'enzyme d'*Escherichia coli*, elle se retrouve aussi chez les L-thréonine désaminase de biosynthèse de *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Aerobacter aerogenes* et même de *Rhodospirillum rubrum*.

b) *Effet du pH.*

L'extrême instabilité de l'enzyme, déjà signalée par UMBARGER et BROWN [22-23], est considérablement accrue aux pH acides. En présence de phosphate de K en solution molaire, lorsque le pH est amené à des valeurs inférieures à 6,5 l'enzyme s'inactive très rapidement ; par contre entre pH 7,5 et 10 l'enzyme peut être conservé sans perte importante d'activité.

TABLEAU II.

Essais de stabilisation de la L-thréonine désaminase de biosynthèse.

P. 100 d'activité perdue en 5 minutes		
Contrôle	50	
★	<i>M</i>	$10^{-1} M$
Glycine (Na)	2,3	4
Glycyl-glycine (Na)	1,8	35,5
Phosphate de potassium...	3,2	50
Phosphate de sodium	0	70
Citrate de sodium	0	46,3
Acétate de sodium.....	6,1	43
Chlorure de potassium ...	16,6	48,5
Chlorure de sodium	9	38
Chlorure d'ammonium.....	34,5	32
★	<i>10 p. 100</i>	<i>1 p. 100</i>
Glucose	29,6	56
Glycérol.....	32	38
Ethylène glycol.....	—	61
★	$10^{-1} M$	$10^{-2} M$
β-mercaptoéthanol.....	27,6	33,5
★	$10^{-2} M$	$10^{-3} M$
Magnésium titriplex.....	22	32,6
★	20 μg	5 μg
Phosphate de pyridoxal...	40	50

Une préparation de L-thréonine désaminase en phosphate de potassium M pH 8,0 est diluée 10 fois dans une solution dans l'eau distillée de chacun des composés essayés. Le pH de chaque solution a été au préalable ajusté à 8,0. Les essais d'activités sont effectués sur des aliquotes prélevés au cours de l'inactivation en suivant la méthode générale.

c) *Effets de la température.*

En présence de concentrations élevées de phosphate et à des pH voisins de 8, la L-thréonine désaminase extraite d'*E. coli* est stable à la température du laboratoire et même peut être portée à des températures voisines de 60°C pendant plusieurs minutes sans perte appréciable d'activité. Toutefois au cours de ces traitements certaines propriétés spécifiques de l'enzyme en particulier sa sensibilité à la L-isoleucine, peuvent être altérées ; nous reviendrons plus loin sur ce point (Article V).

Dans les mêmes conditions de force ionique, aux températures voisines de 0°C, l'enzyme extrait d'*E. coli* est stable. Il diffère en cela de la L-thréonine désaminase de biosynthèse extraite de *Salmonella typhimurium* (FREUNDLICH et UMBARGER [34]) ou de *Rhodospirillum rubrum* (DATTA et al. [35]) qui, bien que stables à 27 ou même à 37°C, s'inactivent à 0°C.

d) *Effets des acides aminés.*

L'inhibiteur régulateur, la L-isoleucine, protège la L-thréonine désaminase de biosynthèse contre l'inactivation thermique qui se produit lorsque, à 27°C, la force ionique du milieu est brutalement abaissée (CHANGEUX [16]) (Fig. 4). En présence de L-isoleucine 10^{-4} M la demi-vie de l'enzyme est accrue d'un facteur cinquante. Cette propriété a été exploitée pour déterminer l'affinité intrinsèque de la molécule pour la L-isoleucine (Article III).

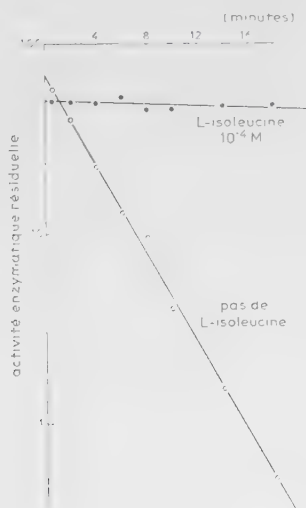


FIG. 4. — Action protectrice de la L-isoleucine sur l'inactivation thermique de la L-thréonine désaminase de biosynthèse.

L'extract brut d'un mutant déréprimé, dialysé contre du phosphate M/3 pH 7,0, dilué 40 fois dans 4,0 ml d'eau distillée équilibrée à 28°C. Les essais d'activité enzymatique sont effectués sur des aliquotes prélevés au cours de l'inactivation en suivant la méthode générale. L'inactivation est suivie en présence de L-isoleucine 10^{-4} M et en son absence (d'après CHANGEUX [16]).

Cet effet n'est pas unique et une action protectrice de l'effecteur de contrôle contre l'inactivation thermique a pu être rerouvée, par la suite, avec plusieurs enzymes de régulation différents de la L-thréonine désaminase de biosynthèse :

Aspartokinases I et II (protection et régulation respectivement par la L-lysine et la L-thréonine) : STADTMAN et al. [36] ; Homosérine déshydrogénase (protection et régulation par la L-thréonine) ; PATTE et al. [37], COHEN et al. [38]...

D'autre part divers acides aminés (glycine, α -aminobutyrate... L-thréonine) protègent eux aussi la L-thréonine désaminase contre l'inactivation thermique. Mais, à la différence de l'effet exercé par la L-isoleucine, ces acides aminés n'agissent qu'à des concentrations supérieures à $10^{-2}M$ et leur action n'est pas spécifique.

Il est vraisemblable que cette dernière propriété se ramène soit à un effet classique de protection par le substrat ou ses analogues, soit à un effet de protection par les forces ioniques élevées, effet du même ordre que ceux précédemment signalés pour les phosphates ou citrates alcalins. Les caractéristiques de l'action protectrice de la L-isoleucine, par contre, sont déjà une suggestion de la présence d'un récepteur spécifique de cet aminoacide. (Voir article III).

c) *Interprétations.*

L'extrême instabilité de la L-thréonine désaminase de biosynthèse telle qu'elle a été décrite dans les paragraphes qui précèdent, mérite d'être retenue comme une propriété originale de cet enzyme. Rares en effet sont les enzymes dont la sensibilité à l'inactivation soit si grande et il est séduisant de voir là une propriété qui puisse être reliée à la fonction régulatrice de l'enzyme. Nous verrons par la suite que la molécule de L-thréonine désaminase est constituée par l'assemblage de plusieurs sous-unités vraisemblablement identiques et que l'interaction régulatrice élémentaire dont elle est l'objet dépend directement de cette structure. Doit-on mettre en relation l'instabilité de l'enzyme avec l'existence d'une architecture quaternaire de la molécule particulièrement labile : la dispersion irréversible en sous-unités serait-elle responsable de l'inactivation de l'enzyme ? Dans cette hypothèse, les plus efficaces protecteurs de l'enzyme, la L-isoleucine comme les forces ioniques élevées en provoquant un accroissement des forces d'interaction entre sous-unités maintiendraient la molécule sous une forme associée et active. Nous verrons par la suite qu'effectivement, du moins en ce qui concerne l'effet de la L-isoleucine, cette hypothèse se vérifie (Article V).

VI. — PROCÉDÉS DE FRACTIONNEMENT.

Un grand nombre de procédés de fractionnement usuels se sont trouvés exclus par les conditions très limitées de stabilité de la L-thréonine désaminase. La chromatographie sur colonnes de cellulose par exemple (DEAE cellulose et DEAE Séphadex) n'a pu être menée à bien parce que s'accompagnant de pertes d'activités considérables : d'une part l'adsorption de l'enzyme sur ces colonnes s'effectue à des concen-

trations salines faibles en présence desquelles l'enzyme est très instable, d'autre part les particules de DEAE sous forme anionique, provoquent une inactivation importante de l'enzyme. La présence de protecteurs variés : L-isoleucine, magnésium titriple, β -mercaptoéthanol à diverses concentrations n'a pas permis d'améliorer sensiblement la méthode. Sont exclues aussi par la présence de phosphate concentré dans les extraits les procédés de fractionnement à l'alcool ou à l'acétone, l'absorption sur gels. Seuls ont été retenus les procédés de précipitation différentielle au sulfate d'ammonium et le traitement thermique.

Dans une première série de fractionnements effectués sans précautions spéciales (CHANGEUX [16]) a été obtenue à partir d'un extrait brut de la souche Hfr H R⁻(isol) une préparation purifiée 20 fois environ par rapport à l'extrait initial soit avec une activité spécifique accrue 250 à 300 fois par rapport à un extrait brut de souche sauvage. Mais plusieurs caractéristiques cinétiques importantes de l'activité désaminasique avaient été perdues au cours du fractionnement (article IV). Nous avons donc repris avec soin chacune des étapes successives de ce fractionnement et observé que les propriétés originales de l'enzyme sont préservées à condition d'une part d'effectuer les manipulations en présence de L-isoleucine et de phosphate de pyridoxal, d'autre part, de n'utiliser que du sulfate d'ammonium spécialement débarrassé des métaux lourds (Mann and Co et Sigma Ltd).

Le protocole de fractionnement est alors le suivant :

1. *Premier traitement thermique* : l'extrait de la souche déréprimée préparé dans les conditions décrites p. 935 est porté à 55°C au bain marie et laissé cinq minutes à cette température puis refroidi rapidement dans un bain glacé. Après une première centrifugation le culot est resuspendu dans le milieu d'extraction puis centrifugé une deuxième fois, les surnageants des deux centrifugations sont rassemblés et conservés.

2. *Précipitation au $SO_4(NH_4)_2$* . A cet extrait est ajouté du sulfate d'ammonium purifié (Mann) pulvérisé à raison de 10 g sec pour 100 ml de solution. Le précipité est laissé se former 1 h à 0°C. Après centrifugation le surnageant est recueilli et 10 g/ml de $SO_4(NH_4)_2$ sont de nouveau mélangés progressivement amenant la concentration finale à 20 g/100 ml. Après une heure de précipitation à 0°C suivie de centrifugation, le culot de centrifugation est conservé et redissous dans le milieu suivant :

Tampon phosphate 3×10^{-1} M, pH 8,1
 Citrate trisodique 10^{-1} M, pH 8,2
 L-isoleucine 10^{-3} M
 Pyridoxal phosphate 10 μ g/ml.

Un deuxième fractionnement au sulfate d'ammonium est ensuite effectué dans des conditions semblables aux précédentes et après une

première précipitation par 10 g/ml de $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ pulvérisé au surnageant sont mêlés 5 g/100 ml de $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$. Ce dernier précipité est recueilli et dissous dans le milieu précédemment décrit.

3. *Deuxième traitement thermique.* Des parties aliquotes de 10 ml de la préparation précédente sont portées à 65°C pendant trois minutes plus refroidies brusquement à 0°C et centrifugées. Le surnageant seul est conservé.

Le Tableau III récapitule les diverses étapes du fractionnement et il est clair que celui-ci s'est opéré sans perte excessive d'activité. L'activité spécifique obtenue n'est que de 11,5 fois supérieure à celle de l'extrait brut de départ. Il faut remarquer à ce propos que l'extrait a été préparé à partir de bactéries dérégprimées pour la L-thréonine

TABLEAU III.

Tableau récapitulatif des étapes successives du fractionnement de la L-thréonine désaminase de biosynthèse d'un extrait brut d'une souche dérégprimée d'E. coli K 12.

	Activité totale (*)	Activité spécifique (**)	Facteur de purification
Extrait brut.....	3000	87	—
Premier traitement thermique.....	2650	230	2,6
Fractionnement au sulfate d'ammonium 15 g/100 ml.....	700	610	7,0
Second traitement thermique.....	735	1011	11,5

(*) En μM acide cétonique produit par minute.

(**) En m μM acide cétonique produit par minute et par mg de protéine.

désaminase donc environ quinze fois plus riches en enzyme que les bactéries sauvages ; la thréonine désaminase de la préparation finale a donc une activité spécifique près de 200 fois supérieure à celle présente dans les extraits de bactéries sauvages.

Méthode décrite dans le texte p. 943.

En dépit des nombreuses tentatives effectuées, la purification de la thréonine désaminase n'a pu être poussée plus avant ; elle reste toujours entravée par l'exceptionnelle instabilité de l'enzyme.

RÉSUMÉ.

La L-thréonine désaminase de biosynthèse catalyse chez *E. coli* K 12 la première étape spécifique de la biosynthèse de la L-isoleucine : la désamination non oxydative de la L-thréonine en α -cétobutyrate. La L-isoleucine règle le fonctionnement de sa propre chaîne de biosynthèse en inhibant l'activité de cet enzyme.

Après la mise au point d'une technique rapide et sûre de dosage, les conditions très particulières de stabilité de la L-thréonine désaminase de biosynthèse ont été définies : les forces ioniques élevées ainsi que l'inhibiteur de contrôle sont d'excellents protecteurs de l'activité. Moyennant quoi dialyse et fractionnement de l'enzyme ont pu être menés à bien sans perte appréciable de l'activité.

SUMMARY.

Biosynthetic L-threonine deaminase catalyses in *E. coli* K 12, the first specific step in the biosynthesis of l-isoleucine : the non oxydative deamination of L-threonine to α -ketobutyrate. L-isoleucine controls the functioning of its biosynthetic chain by feed-back inhibition of the activity of this enzyme. The development of a rapid and reliable assay has made it possible to define the very unusual conditions for stability of biosynthetic L-threonine deaminase. High ionic strength and the feed-back inhibitor are both excellent protectors of the enzyme's activity. A knowledge of these conditions for stability enable the dialysis and fractionation of the enzyme to be carried out without appreciable loss of activity.

ZUSAMMENFASSUNG.

Die biosynthetische L-Threonin-Deaminase katalysiert bei *E. coli* K 12 die erste spezifische Etappe der Biosynthese des L-Isoleucins : die nicht oxydierende Deamination des L-Threonins zu α -Ketobutyrat. Das L-Isoleucin kontrolliert das Funktionieren seiner eigenen Biosynthesekette indem es die Aktivität dieses Enzyms hemmt.

Nach Ausarbeiten eines raschen und zuverlässigen Bestimmungsverfahrens, wurden die sehr eigentümlichen Stabilitätsbedingungen der biosynthetischen L-Threonin-Deaminase bestimmt : die hohen Ionenstärken sowie der Kontroll-Inhibitor sind vorzügliche Schützer der Aktivität. Dadurch konnten Dialyse und Fraktionierung des Enzyms ohne bedeutenden Tätigkeitsverlust durchgeführt werden.

BIBLIOGRAPHIE.

1. MONOD, J. et JACOB, F. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1961, **26**, 389.
2. MONOD, J., CHANGEUX, J. P. et JACOB, F. — *J. Mol. Biol.*, 1963, **6**, 306.
3. NOVICK, A. et SZILARD, L. — In « Dynamics of growth processes », Princeton Univ. Press, 1954, 21.
4. UMBARGER, H. E. — *Science*, 1956, **123**, 848.
5. YATES, R. A. et PARDEE, A. B. — *J. Biol. Chem.*, 1956, **221**, 757.
6. JACOB, F. et MONOD, J. — *J. Mol. Biol.*, 1961, **3**, 318.
7. RUDMAN, D. et MEISTER, A. — *J. Biol. Chem.*, 1953, **200**, 591.
8. ADELBERG, E. A. et UMBARGER, H. E. — *J. Biol. Chem.*, 1953, **205**, 475.
9. MYERS, J. W. et ADELBERG, E. A. — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1954, **40**, 493.
10. STRASSMAN, M., LOCKE, L. A., THOMAS, A. et WEINHOUSE, S. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, **78**, 1599.
11. KUHN, R. et WIELAND, T. — *Ber.*, 1942, **75**^b, 121.
12. MAAS W. K. — Fourth Internat. Congress of Biochemistry, 1958, **11**, « Vitamin Metabolism », 161.
13. UMBARGER, H. E. et BROWN, B. — *J. Biol. Chem.*, 1958, **233**, 1156.
14. CHANGEUX, J. P. — *J. Mol. Biol.*, 1962, **4**, 220.
15. FREUNDLICH, M., BURNS, R. O. et UMBARGER, H. E. — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1962, **48**, 1804.
16. CHANGEUX, J. P. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1961, **26**, 313.

17. JACOB, F. et WOLLMAN, E. — « Sexuality and the genetics of bacteria », Academic Press, N.Y. and London, 1961.
 18. JACOB, F. et MONOD, J. — *C. R. Acad. Sci.*, 1959, **249**, 1282.
 19. BRAUNSTEIN, A. E. et SHEMYAKIN, M. M. — *Doklady Akad. Nauk SSSR*, 1952, **85**, 1115 ; 1953, *Biokhimiya*, **18**, 393.
 20. METZLER, D. E., IKAWA, M. et SNELL, E. E. — *J. Am. Chem. Soc.* 1954, **76**, 648.
 21. UMBARGER, H. E. et BROWN, B. — *J. Bacteriol.*, 1956, **71**, 443.
 22. UMBARGER, H. E. et BROWN, B. — *J. Bacteriol.*, 1957, **73**, 105.
 23. UMBARGER, H. E. et BROWN, B. — *J. Biol. Chem.*, 1957 **233**, 415.
 24. UMBARGER, H. E. — *Fed. Proc.*, 1956, **15**, 374.
 25. HAYES, W. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1953, **18**, 75.
 26. JACOB, F. et WOLLMAN, E. L. — *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **245**, 1840.
 27. TAYLOR, A. L. et ADELBERG, E. A. — *Genetics*, 1960, **45**, 1233.
 28. WOLLMAN, E. L. et JACOB, F. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 323.
 29. ORMEROD, J. G., ORMEROD, K. S. et GEST, H. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, **94**, 449.
 30. KAUDEWITZ, F. — *Nature*, 1959, **183**, 1829.
 31. YANOFSKY, C. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1963, **28**, 581.
 32. DAVIS, B. D. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1948, **70**, 4267.
 33. FRIEDMANN, T. E. et HAUGEN, G. E. — *J. Biol. Chem.*, 1943, **147**, 415.
 34. FREUNDLICH, M. et UMBARGER, H. E. — *Cold. Spr. Harb. Symp. Quant Biol.*, 1963, **28**, 505.
 35. DATTA, P., GEST, H. et SEGAL, H. — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1964, **51**, 125.
 36. STADTMAN, E. R., COHEN, G. N., LE BRAS, G. et DE ROBICHON SZULMAJSTER, H. — *J. Biol. Chem.*, 1961, **236**, 2033.
 37. PATTE, J. C., LE BRAS, G., LOVINY, T. et COHEN, G. N. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1963, **67**, 16.
 38. COHEN, G. R., PATTE, J. C., TRUFFA-BACHI, P., SAWAS, C. et DOUDOROFF, M. — Colloque International C.N.R.S. « Mécanismes de régulation des activités cellulaires chez les microorganismes », Marseille, 1963, (sous presse).
-

**SUR LES PROPRIÉTÉS ALLOSTÉRIQUES
DE LA L-THRÉONINE DÉSAMINASE DE BIOSYNTHÈSE.
II. — CINÉTIQUES D'ACTION DE LA L-THRÉONINE
DÉSAMINASE DE BIOSYNTHÈSE
VIS-A-VIS DU SUBSTRAT ET DE L'INHIBITEUR NATURELS,**

par J.-Pierre CHANGEUX.

Institut Pasteur, Service de Biochimie cellulaire.

(Mémoire reçu le 10 juin 1964).

Le travail expérimental présenté dans cet article et dans les suivants s'est développé à partir des observations préliminaires de UMBARGER [1, 2] et de UMBARGER et BROWN [3, 4]. On doit à ces auteurs l'importante découverte que dans les extraits bruts d'*E. coli* l'activité de la L-thréonine désaminase de biosynthèse est fortement inhibée par L-isoleucine. Ces auteurs remarquèrent en outre que les cinétiques d'action de cet enzyme vis-à-vis de la L-thréonine et de la L-isoleucine ne suivent pas les lois simples de HENRI et MICHAELIS. Ils proposèrent d'interpréter ce résultat en supposant l'ordre de la réaction de désamination égal à deux.

Notre première approche a été de reproduire les observations de UMBARGER et BROWN, puis de tenter de les interpréter.

Dans l'hypothèse où ces observations étaient répétées, trois interprétations étaient plausibles :

1°) La technique de dosage est imparfaite : les activités mesurées ne peuvent être considérées comme des vitesses initiales. Les propriétés observées ne sont qu'apparentes.

2°) Les propriétés décrites par UMBARGER et BROWN sont des propriétés intrinsèques de l'enzyme et les lois d'action vis-à-vis de la L-thréonine et de la L-isoleucine sont *strictement bimoléculaires*.

3°) Les effets observés sont comme dans l'hypothèse n° 2 liés à une structure caractéristique de l'enzyme, mais les cinétiques d'action ne suivent pas les lois bimoléculaires et constituent une propriété originale et spécifique de ce type d'enzyme qu'il faut analyser et interpréter.

Les faits présentés ci-après nous permettront de retenir la dernière de ces trois hypothèses.

I. — CINÉTIQUES D'ACTION VIS-A-VIS DU SUBSTRAT.

Bien que le phosphate de pyridoxal participe à la réaction de désamination de la L-thréonine, la présence de ce coenzyme ne stimule pas les activités enzymatiques déterminées *in vitro* de plus de 20 p. 100. Le complexe enzyme-phosphate de pyridoxal est vraisemblablement très stable et ne se dissocie guère au cours des manipulations habituelles de l'enzyme (à titre de précaution, un excès de phosphate de pyridoxal (10-20 $\mu\text{g/ml}$) a été systématiquement ajouté au milieu de dosage).

Sur la figure 1 (graphique de gauche) est représentée la courbe de saturation de la L-thréonine désaminase par la L-thréonine ; la concentration de phosphate de pyridoxal est maintenue constante. Dans ces conditions, il est remarquable de constater que la loi de variation des vitesses de production d'acide α -cétonique en fonction des concentrations de L-thréonine *n'est pas une loi hyperbolique* (HENRI [6], MICHAELIS et MENTEN [7]). Une courbe d'apparence sigmoïde obtenue et sa transformation par inversion ne donne pas une droite (Fig. 1) ; nous sommes bien en présence d'une réaction enzymatique dont l'ordre est, au moins en apparence, supérieur à l'unité.

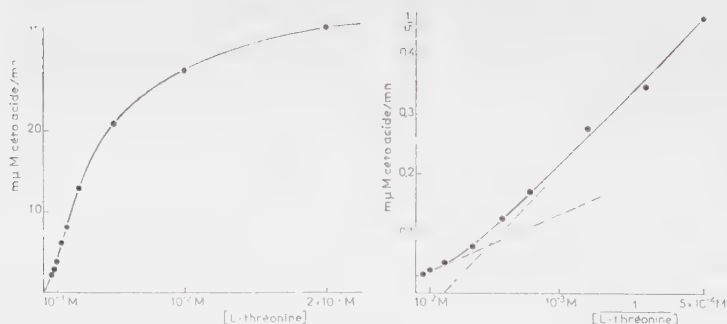


FIG. 1. — Cinétiques d'action de la L-thréonine désaminase de biosynthèse d'une préparation non fractionnée en fonction des concentrations de L-thréonine.

75 $\mu\text{g/ml}$ d'un extrait brut dialysé d'une souche dérèprimée. Dosage suivant la méthode générale (voir article I), pH 7,7.

Graphique de gauche : coordonnées directes.

Graphique de droite : coordonnées inverses.

(En partie d'après CHANGEUX 1961 [5]).

L'observation de UMBARGER et BROWN [3, 4] se trouve donc bien reproduite. Toutefois, il est légitime de se demander si l'allure exceptionnelle des courbes de saturation par le substrat représente une propriété intrinsèque de l'enzyme et n'est pas plutôt la conséquence de défauts dans les mesures d'activité (hypothèse n° 1).

Dans les conditions de dosage utilisées, en effet, des activateurs, inhibiteurs ou systèmes enzymatiques étrangers, présents à côté de l'enzyme dans les extraits bruts pourraient interférer avec la mesure. Ou bien encore si le produit de la réaction était activateur de l'enzyme (c. HOLZER *et al.* [8]) ou si l'enzyme était instable dans les conditions de l'essai, les activités mesurées ne devraient pas être prises pour des vitesses initiales.

Les données expérimentales suivantes permettent de rejeter cette hypothèse :

1°) Dans les conditions de mesure, aux faibles comme aux fortes concentrations de substrats nous avons vérifié que la vitesse de la réaction de désamination est constante en fonction du temps (Fig. 2).

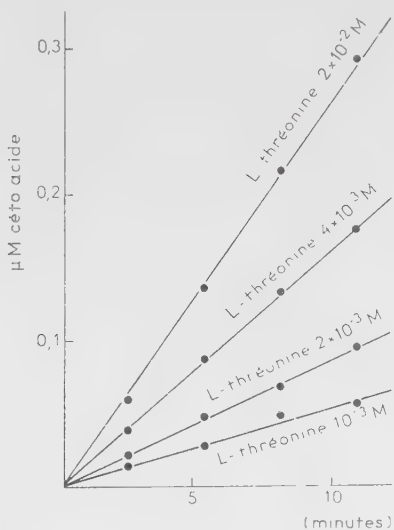


FIG. 2. — Dosage de la L-thréonine désaminase de biosynthèse, à plusieurs concentrations différentes de substrat.

Méthode générale de dosage. 40 $\mu\text{g/ml}$ en protéines d'un extrait brut dialysé d'une souche déréprimée.

2°) Des formes de courbes parfaitement identiques sont obtenues à partir d'un extrait brut dialysé ou d'une préparation d'enzyme enrichie, par rapport à celle-ci, plus de 10 fois. Un fractionnement soigneux de l'enzyme n'entraîne pas la perte des anomalies cinétiques (comparer les figures 1 et 4).

La loi multimoléculaire d'action de la L-thréonine désaminase de biosynthèse est donc une propriété intrinsèque de la molécule d'enzyme.

Cette conclusion se trouve *a contrario* confirmée par le fait que certains traitements que l'on sait modifier la structure des molécules protéiques entraînent, lorsqu'ils sont appliqués à une préparation de L-thréonine désaminase de biosynthèse, la disparition des particularités cinétiques de l'enzyme (cf. article III) :

Par exemple lorsque le dosage est effectué à des pH supérieurs à 8,5 la forme sigmoïde de la courbe de saturation par le substrat n'est plus apparente (Fig. 4). Cette disparition est réversible et un enzyme porté à pH 9 puis ramené à pH 7,7 retrouve ses particularités cinétiques.

Dans d'autres cas (purification en l'absence de protecteurs (cf. CHANGEUX [5] et Article I) chauffage à 55°C, effet des mercuriels...) l'altération de la molécule est permanente et la disparition des anomalies cinétiques n'est pas directement réversible (cf. article IV).

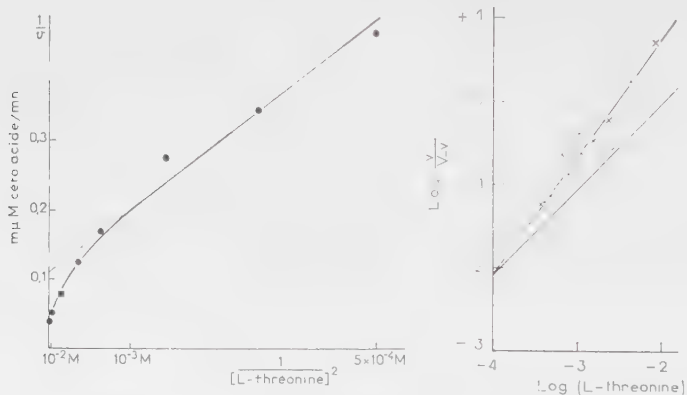


FIG. 3. — Analyse de la courbe d'action de la L-thréonine désaminase sur la L-thréonine.

Mêmes données expérimentales que pour la figure 1.

Graphique de gauche : l'inverse des vitesses initiales mesurées à des concentrations variées de substrat est porté en fonction de l'inverse du carré des concentrations de substrat.

Graphique de droite : les données expérimentales sont portées dans le système de coordonnées de HILL : voir texte p. 952.

(En partie d'après MONOD, CHANGEUX et JACOB [11]).

Etant bien établi que le mode d'action particulier de la L-thréonine désaminase de biosynthèse sur la L-thréonine constitue une propriété structurale caractéristique de la molécule d'enzyme, il reste à choisir entre les hypothèses n° 2 et n° 3 énoncées plus haut à savoir si oui ou non la réaction catalysée est de second ordre en fonction de la concentration de substrat.

Une première analyse de la courbe d'action peut être obtenue en faisant la construction suivante : l'inverse des activités déterminées à des concentrations variées de L-thréonine est porté en fonction de l'in-

verse du carré de ces concentrations (Fig. 3) (UMBARGER et BROWN [3, 4], CHANGEUX [5]). S'il s'agit d'une réaction bimoléculaire la courbe

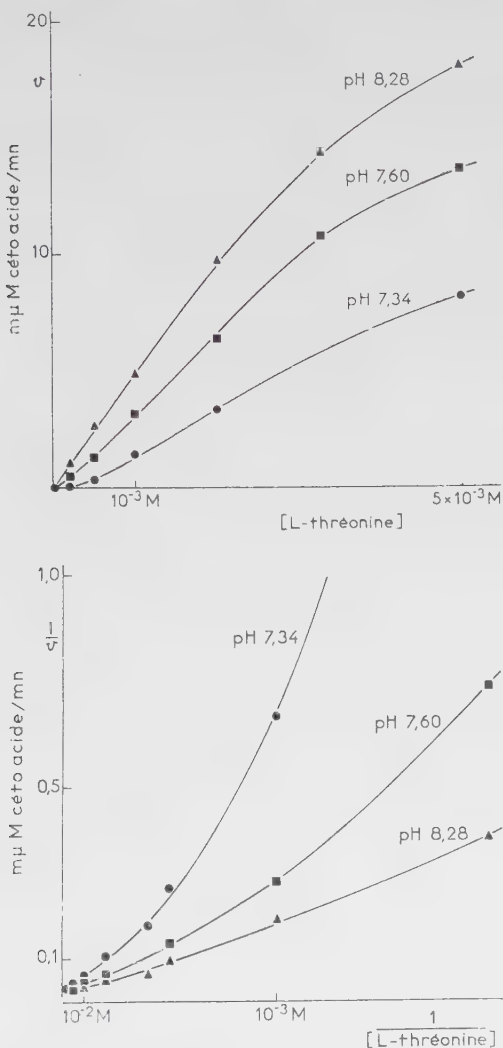


FIG. 4. — Cinétique d'action de la L-thréonine-désaminase de biosynthèse d'une préparation partiellement purifiée en fonction des concentrations de la L-thréonine aux pH 7,34, 7,60 et 8,28.

12 $\mu\text{g/ml}$ d'une préparation purifiée 13 fois suivant la méthode décrite Article I et dialysée. Conditions de dosage : citrate de sodium $2 \cdot 10^{-1}\text{M}$ phosphate de pyridoxal 20 $\mu\text{g/ml}$, volume total 1,0 ml ; température 27°C .
Graphique du haut : coordonnées directes.
Graphique du bas : coordonnées inverses.

expérimentale doit être transformée en une droite. La plupart des points expérimentaux portés dans ce diagramme effectivement s'alignent, toutefois plusieurs d'entre eux, en particulier ceux correspondant aux mesures faites à forte concentration de substrat, s'en écartent systématiquement. La loi d'action de la L-thréonine désaminase de biosynthèse n'est *pas une loi strictement bimoléculaire*.

De plus rien, dans l'équation chimique de la réaction ne laisse présumer que deux molécules de substrat soient nécessaires pour que la réaction de désamination ait lieu : il existe plusieurs enzymes qui bien que catalysant la même réaction de désamination la L-thréonine désaminase du foie par exemple (SAYRE et GREENBERG [9], DAVIS et METZLER [10]) suivent les lois simples de MICHAELIS. Les cinétiques observées spécifiques non de la réaction chimique mais de l'enzyme de biosynthèse ont donc des caractéristiques qui n'entrent pas dans la catégorie des réactions de second ordre. Elles méritent une analyse appropriée. Nous nous sommes inspirés pour ce faire des résultats relatifs aux équilibres de fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine, équilibres dont les courbes présentent de remarquables analogies de forme avec les courbes d'action de la L-thréonine désaminase de biosynthèse sur son substrat.

Il est de longue date connu (BOHR [12]) que la courbe d'équilibre de l'oxygène avec l'hémoglobine ne suit pas l'isotherme d'adsorption de Langmuir mais a une forme sigmoïde significativement différente de celle d'une hyperbole qui favorise la régulation du transfert d'oxygène par le sang. Il a pu être établi que cette forme est conséquence de la fixation simultanée de plusieurs molécules d'oxygène par molécule d'hémoglobine et de l'établissement d'*interactions d'affinité* entre les *récepteurs spécifiques* de l'oxygène c'est-à-dire entre les quatre hèmes (WYMAN [13]). La première tentative d'analyse mathématique de cette courbe d'équilibre a été faite empiriquement par HILL [14] en portant les valeurs expérimentales dans le système de coordonnées suivant : en abscisse $\log_N p$, p étant la pression partielle d'oxygène

et en ordonnée $\log_N \frac{1 - \bar{Y}}{\bar{Y}}$, $\bar{Y}$ étant la fraction de saturation de l'hémoglobine $\frac{\text{Hb} + \text{Hb O}_2}{\text{Hb O}_2}$ mesurable expérimentalement.

On obtient alors une courbe qui, *dans sa partie moyenne*, peut être assimilée à une droite de pente n . Son équation est en première approximation :

$$\log_N \frac{1 - \bar{Y}}{\bar{Y}} = n \log_N p \quad (\text{équation de HILL})$$

Il est remarquable que la valeur de n déterminée par ce moyen empirique peut être considérée comme une constante caractéristique d'un équilibre donné et significative de propriétés moléculaires importantes de la protéine (WYMAN [13, 15]).

L'application de ce type d'analyse graphique à la courbe d'action de la L-thréonine désaminase de biosynthèse ne peut être faite sans précaution. En effet, les équations d'équilibre de l'hémoglobine concernent l'établissement de complexes réversibles hémoglobine-oxygène : le ligand une fois complexé ne subit aucune transformation ; il n'en est pas de même pour un enzyme qui dès l'établissement du complexe avec le substrat catalyse la transformation du substrat en produit P de la réaction. Toutefois, si les vitesses de formation et de destruction du complexe enzyme-substrat sont égales c'est-à-dire si, durant la mesure d'activité, la concentration de complexe reste constante, alors les vitesses initiales déterminées seront proportionnelles aux concentrations de complexe enzyme-substrat (BRIGGS et HALDANE [16]). Dans cette hypothèse, il est légitime de tracer la courbe d'action de l'enzyme sur son substrat dans le système de coordonnées suivant adapté du diagramme de HILL : en abscisse $\log S$ et en ordonnée $\log \frac{V_{\max} - v}{v}$.

S'il n'existe qu'une seule catégorie de récepteurs enzymatiques indépendants (cas général) la transformée de l'isotherme de Langmuir dans ce type de coordonnées est alors une droite de pente 1. Inversement si la transformée de la courbe d'action est, dans sa partie moyenne, une droite de pente supérieure à 1, on peut dire par analogie avec l'hémoglobine (WYMAN [13]) qu'il y a plusieurs récepteurs du substrat par molécule d'enzyme et que des interactions de stabilisation existent entre ces récepteurs.

La courbe d'action de la L-thréonine désaminase de biosynthèse ainsi tracée est effectivement, dans sa partie moyenne, une droite (Fig. 3) (MONOD, CHANGEUX et JACOB [11], CHANGEUX [17]) et la pente n de celle-ci est dans les conditions standard d'essais significativement supérieur à l'unité, bien que *toujours inférieure à 2*.

L'hypothèse d'une loi d'action strictement bimoléculaire de la L-thréonine désaminase sur son substrat se trouve une fois de plus, rejetée. Faisant appel aux données relatives à la molécule d'hémoglobine il est légitime d'attribuer les cinétiques originales de la L-thréonine désaminase :

1°) à la présence par molécule d'enzyme de *plusieurs récepteurs spécifiques du substrat* ;

2°) à l'établissement d'*interactions de stabilisation* entre ces récepteurs.

II. — CINÉTIQUES D'ACTION VIS-A-VIS DE L'INHIBITEUR.

La L-isoleucine est le seul des acides aminés naturels et principaux métabolites à inhiber efficacement *in vitro* l'activité de la L-thréonine désaminase de biosynthèse (Tableau I). En particulier précurseur de la L-thréonine (la L-homosérine), métabolite intermédiaire de la chaî-

TABLEAU I.

Action des acides aminés naturels sur l'activité de la L-thréonine désaminase de biosynthèse mesurée en présence d'une même concentration de L-thréonine (2×10^{-1} M).

Concentration d'effecteur	p. 400 Inhibition		
	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
L-isoleucine	47	98	100
L-leucine	4	5	27
L-valine		5	7
L- α amino butyrique		2	5
L-alanine		0	0
L-glycine		0	2
L-aspartique		0	0
L-glutamique		2	14
L-arparagine		6	31
L-glutamine		2	3
L-cystéine		16	27
L-méthionine		0	12
L-arginine HCl		15	21
L-lysine HCl		0	24
L-histidine HCl		8	21
L-proline		1	10
L-phénylalanine	0	0	
L-tyrosine	3	6	
L-tryptophane	5	8	
L-homosérine		11	42
DL-dihydroxy β méthylvalérate		1	0
d-pantothénate Ca^{++}		4	0

Essais suivant la méthode générale. 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en protéines d'un extrait brut dialysé d'une souche déréprimée.

ne de synthèse de la L-isoleucine à partir de la L-thréonine (le DL-dihydroxy β -méthyl valérate), produit de chaînes collatérales (la L-valine, la L-leucine, le d-pantothénate) n'inhibent pas ou peu l'activité de l'enzyme. Mieux, l'affinité apparente de la L-isoleucine mesurée en présence de L-thréonine semble considérablement supérieure à l'affinité apparente de la L-thréonine (tableau I et Fig. 5). Tous ces faits apportent d'excellentes confirmations du rôle régulateur assigné à l'enzyme.

Il est remarquable de constater que l'inhibition de l'enzyme par la L-isoleucine, en dépit de la différence de structure existant entre le substrat et l'effecteur de contrôle, présente certaines caractéristiques cinétiques de l'inhibition dite « compétitive », phénomène classiquement observé en présence d'un analogue de substrat :

1°) lorsque les mesures sont faites en présence de concentrations fixes du substrat et de concentrations croissantes d'inhibiteur, les vitesses initiales tendent vers zéro ;

2°) lorsque les mesures sont faites en l'absence d'inhibiteur ou en présence de concentrations fixes d'inhibiteur mais à des concentrations croissantes de substrat, les vitesses initiales tendent vers une même vitesse maximum.

Il est clair sur la Fig. 5 que la L-isoleucine modifie l'affinité apparente de l'enzyme pour la L-thréonine : tout se passe *comme si* il y avait exclusion mutuelle entre la L-isoleucine et la L-thréonine donc *comme si* L-isoleucine était un inhibiteur « compétitif » de l'enzyme.

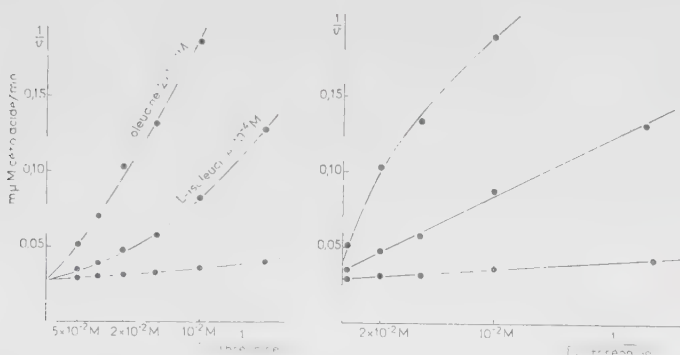


FIG. 5. — Inhibition par la L-isoleucine de la L-thréonine désaminase de biosynthèse, d'une préparation non fractionnée, en présence des concentrations croissantes de L-thréonine.

30 $\mu\text{g/ml}$ d'un extrait brut dialysé d'une souche déréprimée. Méthode générale de dosage. $\text{pH } 8,0$.

Graphique de gauche : coordonnées inverses.

Graphique de droite : l'inverse des vitesses initiales est porté en fonction de l'inverse du carré des concentrations de substrat.

(En partie d'après CHANGEUX [5]).

Mais, dans ce cas comme dans celui de l'action de l'enzyme sur la L-thréonine seule, les courbes obtenues ne se superposent pas aux courbes classiques de la cinétique d'HENRI et MICHAELIS ; on peut reconnaître :

1°) des courbes *sigmoïdes* qui ne sont pas des arcs d'hyperbole lorsque les vitesses initiales sont portées directement en fonction des concentrations croissantes d'inhibiteur, la concentration de substrat restant fixe (Fig. 6) ;

2°) des courbes complexes qui *ne sont pas des droites* lorsque les données expérimentales sont portées dans le système de coordonnées de LINEWEAVER et BURK (Fig. 5).

L'action de la L-isoleucine s'accompagne donc d'effets d'ordre supérieurs par rapport aux concentrations de la L-isoleucine ; effets interprétés par UMBARGER et BROWN comme des effets bimoléculaires.

Les hypothèses générales formulées dans l'introduction de cet article peuvent être reprises à nouveau. La réfutation de la première de celles-ci reposent sur des arguments identiques à ceux précédemment proposés au sujet de l'action du substrat : les activités mesurées en présence d'inhibiteur représentent bien des vitesses initiales et la sensibilité à la L-isoleucine ainsi que les effets multimoléculaires sont préservés par le processus de purification précédemment décrit. De

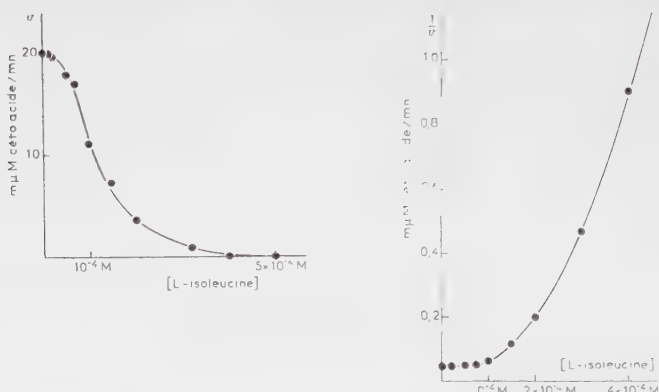


FIG. 6. — Inhibition de la L-thréonine désaminase de biosynthèse d'une préparation non fractionnée en présence d'une concentration limitée de L-thréonine ($2 \times 10^{-2} \text{ M}$) et de concentrations croissantes de L-isoleucine.

Mêmes conditions que pour la figure 5.

Graphique de gauche : coordonnées directes.

Graphique de droite : l'inverse des vitesses initiales mesurées à des concentrations croissantes de L-isoleucine est porté en fonction des concentrations de L-isoleucine.

(En partie d'après CHANGEUX [5]).

plus, les traitements de l'enzyme, cités plus haut, qui entraînent une disparition des effets d'ordre supérieur du substrat (purification en l'absence de protecteurs, traitement thermique, effet du chlorure mercurique, du pH, etc...) altèrent dans le même sens la réactivité de l'enzyme vis-à-vis de la L-isoleucine (cf. art. IV) et peuvent même provoquer la perte de la sensibilité à la L-isoleucine. Ces faits nous autorisent donc à considérer que la sensibilité à la L-isoleucine ainsi que les effets originaux de la cinétique d'inhibition sont des *propriétés intrinsèques* de la molécule de L-thréonine désaminase.

De plus, les effets d'ordre supérieur de la L-isoleucine ne sont pas des effets strictement bimoléculaires : rien ne le laisse prévoir dans la réaction d'inhibition, rien non plus dans les propriétés des courbes

ne nous autorise à le dire (Fig. 5, 6 et 7). Là encore les cinétiques obtenues sont très originales. L'extension de l'emploi du système de coordonnées de Hill à l'analyse des courbes d'inhibition par la L-isoleucine se justifie dans les conditions suivantes :

1°) L'hypothèse de BRIGGS-HALDANE est vérifiée. Il est légitime de le supposer, comme dans le cas général ;

2°) la présence de L-isoleucine modifie uniquement la fraction des molécules d'enzyme sous forme de complexe actif. Nous avons précédemment montré que la L-isoleucine n'affecte pas la vitesse maximum déterminée après extrapolation à concentration infinie de substrat. Cette hypothèse se trouve donc, elle aussi, en première approximation vérifiée.

Dans ces conditions, les vitesses initiales mesurées en présence d'inhibiteur sont proportionnelles aux concentrations de complexe actif. Le système de coordonnées de Hill est alors utilisé comme suit : en

ordonnée $\log_N \frac{v_i}{v_0 - v_i}$ et en abscisse $\log_N i$.

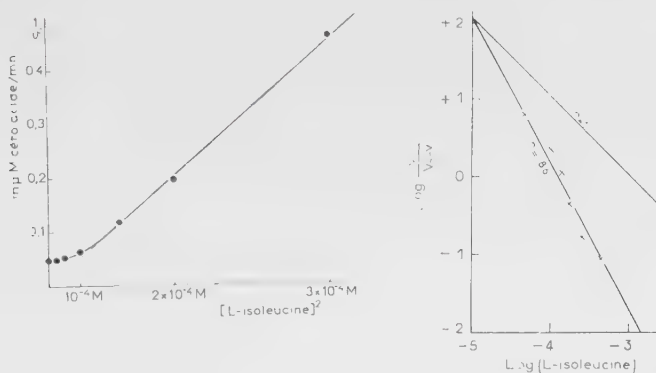


FIG. 7. — Analyse de la courbe d'inhibition de la L-thréonine désaminase par les concentrations croissantes de L-isoleucine.

Mêmes données expérimentales que pour la fig. 5.

Graphique de gauche : l'inverse des vitesses initiales est porté en fonction du carré des concentrations de L-isoleucine.

Graphique à droite : les données expérimentales sont portées dans le système de coordonnées de HILL ; voir texte p. 958.

(En partie d'après MONOD, CHANGEUX et JACOB [11].

Sur la figure 7 ont été portés dans ce système de coordonnées les données expérimentales de la figure 5. Dans la partie moyenne de la courbe, les points s'alignent convenablement et la pente de la droite ainsi déterminée est inférieure à l'unité, on peut alors définir un coefficient n' , l'inverse de la pente en question, dont les valeurs sont supérieures à 1. De même que dans le cas du substrat, la mesure de n' est caractéristique des conditions dans lesquelles les dosages sont effec-

tués et de la préparation d'enzyme utilisée. Elle est le plus souvent comprise entre 1 et 2, parfois supérieure à 2 ($n' = 2,3$ en présence d'éthylène glycol).

Il en résulte que par molécule d'enzyme il existe *plusieurs récepteurs spécifiques de la L-isoleucine* et que des *interactions de stabilisation interviennent* entre ces récepteurs.

III. - CONCLUSIONS.

L'analyse des cinétiques d'action de la L-thréonine désaminase partiellement purifiée à partir d'extraits acellulaires d'*E. coli* K 12 a permis d'établir :

1°) que la L-isoleucine est le seul aminoacide naturel à inhiber spécifiquement l'activité désaminasique et que les modalités de cette inhibition ont, pour une grande part, les apparences d'une exclusion mutuelle ;

2°) que les cinétiques d'action vis-à-vis de la L-thréonine et de la L-isoleucine ne suivent ni les lois simples de HENRI et MICHAELIS, ni les lois strictement bimoléculaires.

Il ressort de ces observations que :

1°) plusieurs molécules de substrat ou d'inhibiteur peuvent se fixer par molécule d'enzyme ;

2°) dans ces conditions, des interactions d'affinité s'établissent entre les molécules de ligand ou leurs récepteurs.

Il est alors possible de distinguer deux types d'interactions :

1°) les interactions *homotropes* qui s'établissent entre molécules identiques (L-thréonine-L-thréonine, L-isoleucine-L-isoleucine) ; elles sont toujours coopératives ;

2°) les interactions *hétérotropes* qui s'établissent entre molécules de structure différente (L-thréonine-L-isoleucine) ; elles sont, dans le cas présent, antagonistes.

Il est remarquable que les conclusions ainsi que la systématisation des interactions fondées sur les observations effectuées à partir de la L-thréonine désaminase de biosynthèse paraissent applicables à la plupart des enzymes de régulation. Citons par exemple : l'aspartate transcarbamylase (GERHART et PARDEE [18] [19] [20], la désoxycytidylate aminohydrolase (SCARANO et al. [21] et SCARANO [22], MALEY et MALEY [23]), la citrate synthétase (WIELAND et WEISS [24]), la phosphofructokinase (MANSOUR [25]), la DPN-isocitrate déshydrogénase de *Neurospora crassa* (SANWALL et al. [26]), la DPN-isocitrate déshydrogénase de levure (HATAWAY et ATKINSON [27]), la L-thréonine désaminase de *Clostridium tetanomorphum* (HAYAISHI et al. [28]), la phosphorylase b (MADSEN [29], SCHWARTZ comm. pers.), l'homosérine déshydrogénase

de *E. coli* (PATTE et COHEN comm. pers.), la « lysine »-aspartokinase de *E. coli* (PATTE et COHEN comm. pers.) etc... Dans chacun de ces exemples des interactions homotropes ont été décelées à côté de l'interaction hétérotrope effecteur régulateur-substrat.

La présence simultanée sur un même enzyme d'interactions homotropes et d'interactions hétéotropes n'apparaît donc pas fortuite. Nous verrons par la suite le parti à tirer de cette importante propriété.

RÉSUMÉ.

1. La L-isoleucine est le seul aminoacide naturel à inhiber efficacement *in vitro* l'activité de la L-thréonine désaminase de biosynthèse. Le contrôle par rétroinhibition est donc spécifique.

2. La L-isoleucine modifie l'affinité apparente de l'enzyme pour la L-thréonine mais pas son activité moléculaire. Malgré la différence de structure notable existant entre substrat et effecteur de contrôle l'antagonisme entre la L-isoleucine et la L-thréonine a, pour une grande part, les apparences d'une exclusion mutuelle.

3. Les cinétiques d'action tant vis-à-vis de la L-thréonine que de la L-isoleucine sont d'ordre supérieur à 1. En outre l'ordre apparent de la réaction varie en fonction de l'atmosphère ionique du milieu et de la présence d'effecteurs spécifiques.

4. Ces propriétés peuvent être conservées par un fractionnement soigneux de l'enzyme, elles constituent des caractéristiques intrinsèques de la molécule de L-thréonine désaminase.

L'interprétation la plus simple est que plusieurs molécules de substrat ou d'inhibiteur se fixent par molécule d'enzyme et que dans ces conditions des interactions d'affinité s'établissent entre les molécules de ligand ou leurs récepteurs : interactions homotropes entre molécules identiques (L-thréonine - L-thréonine ou L-isoleucine - L-isoleucine) toujours coopératives ; interactions hétéotropes entre molécules de structure différente (L-thréonine - L-isoleucine), dans le cas présent, antagonistes.

SUMMARY.

1° L-isoleucine is the only natural amino acid which inhibits effectively *in vitro* the activity of biosynthetic L-threonine deaminase, the control by feed-back inhibition is specific.

2° L-isoleucine affects the apparent affinity of the enzyme for L-threonine but not its molecular activity. In spite of the considerable difference in structure between the substrate and the feed-back inhibitor the apparent competition between L-isoleucine and L-threonine mimics an effect of mutual exclusion.

3° The kinetics of action with both L-threonine and L-isoleucine are of order greater than one. In addition the apparent order of reaction varies as a function of the ionic environment and of the presence of specific effectors.

4° These properties are preserved by a careful fractionation of the enzyme and are therefore intrinsic properties of the molecule of L-threonine deaminase.

The simplest interpretation of these properties is that several molecules of substrate or inhibitor are bound by each molecule of enzyme and that affinity interactions occur between the bound molecules or their receptors, e.g. homotropic interactions between identical molecules (L-threonine - L-threonine or L-isoleucine - L-isoleucine) which are always cooperative ; heterotropic interactions between molecules of different structures (L-threonine - L-isoleucine) which, in the present case, are antagonistic.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Das L-Isoleucine ist die einzige Aminosäure, die *in vitro* die Tätigkeit der biosynthetischen L-Threonin-Deaminase wirksam hemmt. Die Kontrolle durch Rückinhibition ist also spezifisch.

2. Das L-Isoleucin ändert die Scheinaffinität des Enzyms für das L-Threonin, aber nicht seine Molekular-Aktivität. Trotz des bedeutenden Strukturunterschieds zwischen Substrat und Kontrolleffektor, hat der Antagonismus zwischen L-Isoleucin und L-Threonin zum grossen Teil den Anschein eines gegenseitigen Ausschlusses.

3. Die Wirkungs-Kinetik gegenüber des L-Threonins sowie des L-Isoleucins gehört zu einer Ordnung, die grösser als 1 ist. Ausserdem wechselt die scheinbare Ordnung der Reaktion je nach der Ionenatmosphäre des Mediums und der Gegenwart von spezifischen Effektoren.

4. Diese Eigenschaften können durch eine sorgfältige Fraktionierung des Enzyms behalten werden ; sie bilden innere Eigenschaften des L-Threonin-Deaminase-Moleküls.

Die einfachste Erklärung ist, dass mehrere Substrat- und Inhibitormoleküle sich an ein einziges Enzymmolekül binden und dass unter diesen Bedingungen Affinitätsinteraktionen zwischen den Ligandmolekülen oder deren Rezeptoren eintreten : homotrope Interaktionen zwischen identischen Molekülen (L-Threonin-L-Threonin oder L-Isoleucin-L-Isoleucin), immer zuwirkend ; heterotrope Interaktionen zwischen Molekülen von verschiedener Struktur (L-Threonin-L-Isoleucin), im gegenwärtigen Falle antagonistisch.

BIBLIOGRAPHIE.

1. UMBARGER, H. E. — *Science*, 1956, **123**, 848.
2. UMBARGER, H. E. — *Fed. Proc.*, 1956, **15**, 374.
3. UMBARGER, H. E. et BROWN, B. — *J. Bacteriol.*, 1957, **73**, 105.
4. UMBARGER, H. E. et BROWN, B. — *J. Biol. Chem.*, 1957, **233**, 415.
5. CHANGEUX, J. P. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1961, **26**, 313.
6. HENRI, V. — « Lois générales de l'action des diastases », 1903, Hermann, Paris.
7. MICHAELIS, L. et MENTEN, M. L. — *Biochem. Z.*, 1913, **49**, 333.
8. HOLZER, H., CENNAMO, C. et BOLL, M. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1963, **14**, 487.
9. SAYRE, F. W. et GREENBERG, D. M. — *J. Biol. Chem.*, 1956, **220**, 787.
10. DAVIS, L. et METZLER, R. — *J. Biol. Chem.*, 1962, **237**, 1883.
11. MONOD, J., CHANGEUX, J. P. et JACOB, F. — *J. Mol. Biol.*, 1963, **6**, 306.
12. BOHR, C. — *Zentr. Physiol.*, 1903, **17**, 682.
13. WYMAN, J. — *Adv. in Protein Chem.*, 1948, **4**, 407.
14. HILL, A. V. — *J. Physiol.*, 1910, **40**, 4P.
15. WYMAN, J. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1963, **28**, 483.
16. BRIGGS, G. E. et HALDANE, J. B. S. — *Biochem. J.*, 1925, **19**, 338.

17. CHANGEUX, J. P. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1963, 28, 497.
 18. GERHART, J. C. et PARDEE, A. B. — *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 891.
 19. GERHART, J. C. et PARDEE, A. B. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1963, 28, 491.
 20. GERHART, J. C. et PARDEE, A. B. — *Fed. Proc. Symp.* 1963, (sous presse).
 21. SCARANO, E., GERACI, G., POLZELLA, A. et CAMPANILE, E. — *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, PC 1556.
 22. SCARANO, E. — Sixth International Congress of Biochemistry, 1964 (à paraître).
 23. MALEY, F. et MALEY, G. F. — *Science*, 1963, 141, 1278.
 24. WIELAND, O. et WEISS, L. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1963, 13, 26.
 25. MANSOUR, T. E. — *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 2285.
 26. SANWAL, B., ZINK, M. et STACHOW, C. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1963, 12, 510.
 27. HATAWAY, J. A. et ATKINSON, D. E. — *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 2875.
 28. HAYAISHI, O., GEFTER, M. et WEISSBACH, H. — *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 2040.
 29. MADSEN, N. B. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1964, 15, 390.
-



Imprimerie M. DECLUME, Lons-le-Saunier.

**SUR LES PROPRIÉTÉS ALLOSTÉRIQUES
DE LA L-THRÉONINE DÉSAMINASE DE BIOSYNTHÈSE.
III. — INTERPRÉTATION DE L'EFFET INHIBITEUR
DE LA L-ISOLEUCINE :
EMPÊCHEMENT STÉRIQUE OU EFFET ALLOSTÉRIQUE,**

par Jean-Pierre CHANGEUX.

Institut Pasteur, Service de Biochimie cellulaire.

(Mémoire reçu le 10 juin 1964).

Les données cinétiques exposées dans deux précédents articles (*), nous ont amené à conclure que sur la molécule de L-thréonine désaminase de biosynthèse peuvent se fixer plusieurs molécules tant de L-thréonine que de L-isoleucine et que plusieurs types d'interactions d'affinité interviennent entre ces molécules lorsqu'elles se lient à l'enzyme. Dans cet article, nous nous limiterons à l'analyse de l'interaction *hétérotrope* : L-thréonine - L-isoleucine, interaction qui confère à la L-thréonine-désaminase de biosynthèse sa fonction régulatrice.

Rappelons le paradoxe de la situation : malgré les différences de structure des molécules de L-thréonine et de L-isoleucine, les cinétiques d'inhibition de la L-thréonine désaminase par la L-isoleucine sont dans une large mesure du même type que celles observées en présence d'un analogue structural du substrat (inhibition compétitive). L'interaction régulatrice L-thréonine - L-isoleucine a les apparences d'une exclusion naturelle.

Au moins deux modèles (Fig. 1) permettent de rendre compte de ce fait :

Dans un premier modèle, les récepteurs spécifiques de la L-thréonine et de la L-isoleucine se recouvrent mutuellement ou sont suffisamment voisins pour que des interactions *directes* existent entre les molécules de substrat et d'inhibiteur : il y a exclusion par *empêchement stérique*.

(*) Sur les propriétés allostériques de la L-thréonine désaminase de biosynthèse I et II. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1964, 46, 927-961.

Dans un second modèle, les récepteurs sont séparés, il n'y a *pas* d'interactions directes possibles ; l'interaction est indirecte, elle est transmise par l'intermédiaire d'une transition moléculaire de l'enzyme ou *transition allostérique*.

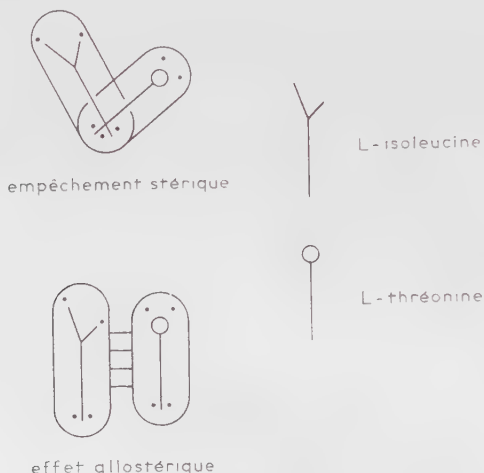


FIG. 1. — Les deux modèles plausibles de l'interaction hétérotrappe L-isoleucine-L-thréonine.

Explications dans le texte (en partie d'après CHANGEUX [1]).

Nous présenterons successivement plusieurs résultats expérimentaux qui doivent forcer notre décision en faveur de l'un des deux modèles proposés. En voici brièvement la liste :

1°) les exigences structurales requises pour qu'un composé soit actif comme substrat ou comme inhibiteur sont profondément différentes ; la mise en évidence d'un authentique inhibiteur compétitif de l'enzyme, analogue structural du substrat, souligne la double spécificité de la molécule ;

2°) les affinités de l'enzyme pour la L-thréonine et la L-isoleucine varient indépendamment en fonction du pH ; c'est là une *preuve* de la distinction des groupes de liaison spécifiques, respectivement de la L-thréonine et de la L-isoleucine ;

3°) divers analogues structuraux de la L-isoleucine antagonisent la L-isoleucine et activent l'enzyme ; ils se fixent sur un récepteur indiscutablement distinct du récepteur de substrat.

Nous verrons que l'interprétation d'ensemble de ces faits n'est pas compatible avec le premier des deux modèles proposés mais oblige à conclure que l'interaction est indirecte et s'effectue par l'intermédiaire d'une transition « *allostérique* ».

Au cours de ce chapitre nous serons amené à comparer les affinités respectives de l'enzyme pour la L-thréonine et la L-isoleucine. Il n'est pas inutile de souligner à ce propos que, compte tenu de l'existence d'interactions d'affinité entre récepteurs tant du substrat que de l'inhibiteur, il ne nous a pas été possible de déterminer simplement par des expériences cinétiques les constantes intrinsèques d'affinité de *chaque* récepteur. C'est pourquoi nous considérerons seulement des affinités *apparentes* de l'enzyme pour ses divers ligands. Par commodité, nous appellerons « *constante de saturation* » en substrat (CSS) : la concentration de substrat en présence de laquelle est mesurée une vitesse égale à la moitié de la vitesse maximum ; « *constante de saturation* » en inhibiteur (CSI) la concentration d'inhibiteur pour laquelle, en présence d'une concentration de L-thréonine voisine de la saturation : 2×10^{-2} M, est mesurée une vitesse moitié de la vitesse déterminée en l'absence d'inhibiteur.

I. — ACTION DES ANALOGUES DU SUBSTRAT ET DE L'INHIBITEUR SUR L'ACTIVITÉ DE LA L-THRÉONINE DÉSAMINASE DE BIOSYNTHÈSE.

Sur le Tableau I sont consignés les résultats d'une série d'expériences qui mettent en évidence quelles sont les structures moléculaires requises pour qu'un composé soit substrat ou inhibiteur. Il est clair que seuls, parmi les analogues de la L-thréonine, les composés de la série *L* (sur le carbone en α) et *thréo* (sur le carbone en β) sont actifs comme substrats. Il en est de même pour les analogues de la L-isoleucine : seuls sont d'actifs inhibiteurs les composés de la série naturelle L-thréo-.

Ces conditions ne sont toutefois pas suffisantes :

1°) Pour qu'une molécule subisse la réaction de désamination en présence d'enzyme, elle doit porter en β -*thréo* un groupement *hydroxyle* ; cependant les γ -hydroxyaminoacides (L-homosérine) et les β -allohydroxyaminoacides (DL et L-allothréonine) ne sont pas substrats. De plus, si l'ossature carbonée de la molécule dépasse quatre atomes de carbone (β -hydroxynorvaline en C_5) l'activité est perdue. Sont seuls actifs les L-thréo, β -hydroxy, α -aminoacides en C_3 et C_4 c'est-à-dire la L-thréonine et la L-sérine.

2°) Pour qu'un composé soit un actif inhibiteur de l'enzyme, une structure dissymétrique de la chaîne carbonée aliphatique est requise : les très proches voisins de la L-isoleucine, à chaîne carbonée symétrique, L-valine, L-leucine, L-alanine, L- α -aminobutyrate, L-norvaline, L-norleucine n'inhibent l'enzyme avec la même efficacité que la L-isoleucine qu'à des concentrations dix à cent fois plus élevées. La structure β -thréo-méthyl-valérique de la chaîne en C_6 est donc indispensable.

TABLEAU I.
Spécificité de la L-thréonine désaminase de biosynthèse.

Inhibiteur		
	p. 100 Inhibition	Concentration produisant 50 p. 100 d'inhibition
L-isoleucine 10^{-2} M	100	$1,2 \times 10^{-4}$ M
N-acétyl L-isoleucine 10^{-2} M	100	3×10^{-4} M
L-isoleucine méthyl ester 10^{-2} M	100	3×10^{-3} M
L-isoleucine hydantoïne 10^{-2} M	90	6×10^{-3} M
N-chloracétyl DL-isoleucine 10^{-2} M	65	$7,5 \times 10^{-3}$ M
DL-alloisoleucine 1×10^{-2} M	50	2×10^{-2} M
DL- α -hydroxyméthylvalérate 2×10^{-2} M	28	
DL-dihydroxyméthylvalérate 2×10^{-2} M	0	
DL-isoleucamine HCl 2×10^{-2} M	7	
L-isoleucine amine HCl 10^{-2} M	6	
D-isoleucine 10^{-2} M	8	
D-alloisoleucine 10^{-2} M	4	
L-leucine 10^{-2} M	27	
L-valine 10^{-2} M	6	
L-norleucine 10^{-2} M	9	
L-norvaline 10^{-2} M	24	

Substrat	
	Vitesses initiales
L-thréonine 2×10^{-2} M	100
L thréonine amide 2×10^{-2} M	67
L thréonine méthyl ester 2×10^{-2} M	41
D-thréonine 2×10^{-2} M	4
DL-allothréonine 2×10^{-2} M	0
DL- α -amino, β -hydroxy-valérianate (β -hydroxy-norvaline) 2×10^{-2} M	0
L-sérine 5×10^{-2} M	92
L-homosérine 5×10^{-2} M	0

Essais suivant la méthode générale. 40 μ g/ml en protéines d'un extrait brut dialysé d'une souche déréprimée. Les inhibiteurs sont essayés en présence d'une même concentration de L-thréonine : 2×10^{-2} M. Les substrats sont essayés aux concentrations indiquées et les vitesses de production de céto-acide sont ramenées à celle de la L-thréonine prise pour 100. pH 8,1 (d'après CHANGEUX [2]).

Ces remarques ainsi que l'observation du tableau I mettent clairement en évidence la dissimilarité de structure existant entre les composés qui sont substrats de l'enzyme et ceux qui en sont d'actifs inhibiteurs. Ceux-ci ne peuvent être considérés comme des analogues structuraux de ceux-là, Il se distingue une double spécificité de la

molécule orientée d'une part vers la L-thréonine, d'autre part vers la L-isoleucine. La présence de cette double spécificité est plus facile à mettre en accord avec le modèle n° 2 qu'avec le modèle n° 1. Elle ne permet pas cependant de rejeter le modèle n° 1.

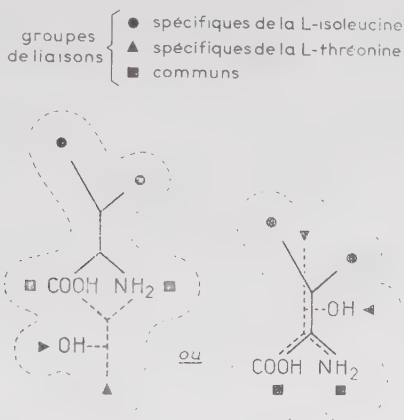


FIG. 2. — Représentation schématique d'un modèle plausible de répartition des groupes de liaisons spécifiques de la L-thréonine et de la L-isoleucine sur la molécule de L-thréonine désaminase de biosynthèse dans l'hypothèse d'un empêchement stérique entre ces molécules.

Explication dans le texte pages suivantes.

En effet, il n'est pas exclu que l'on doive tenir compte de la parenté structurale existant entre les composés actifs sur l'enzyme soit comme substrats soit comme inhibiteurs : tous ont en commun la partie α -amino acide de la molécule. Si l'on tient compte de cette remarque, comment peut-on envisager l'hypothèse d'un empêchement stérique entre L-thréonine et L-isoleucine ? La structure la plus simple du récepteur serait celle pour laquelle les groupes de liaison complémentaires

de la partie commune de la molécule ($-\text{CH} \begin{smallmatrix} \text{NH}_2 \\ \text{COOH} \end{smallmatrix}$) seraient eux-

mêmes *mis en commun* et participeraient à la fois à la liaison de la L-thréonine et de la L-isoleucine (Fig. 2). Dans ces conditions, des substitutions identiques sur les groupements $\alpha\text{-NH}_2$ et $\alpha\text{-COOH}$ des molécules de L-thréonine et de L-isoleucine devraient avoir des conséquences identiques sur leur activité. Les résultats consignés sur le tableau I et la fig. 3 montrent qu'il n'en est rien. Les substitutions sur le groupement $\alpha\text{-COOH}$ de la L-isoleucine affectent considérablement son action inhibitrice : dix fois plus de L-isoleucine méthylester ou même cent fois plus de L-isoleucine-amide que de L-isoleucine sont nécessaires pour obtenir le même pourcentage d'inhibition (Fig. 3).

Les mêmes substitutions sur la molécule de L-thréonine ne l'empêchent pas d'être encore substrat : les constantes de saturation en substrats de la L-thréonine amide (CSS $\sim 5 \times 10^{-3}$ M) et de la

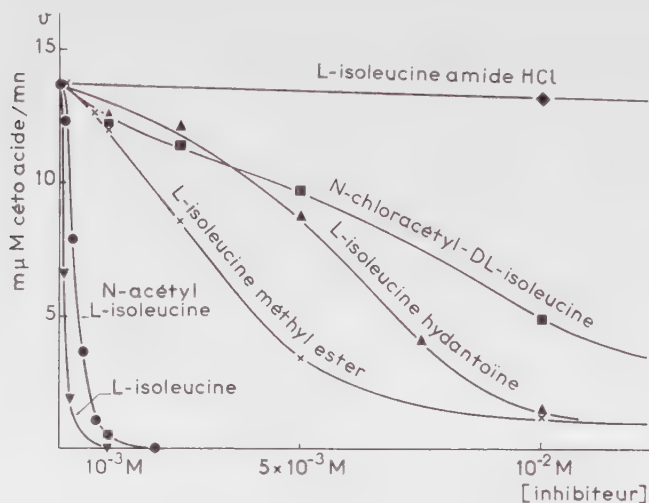


FIG. 3. — Courbe d'inhibition de la L-thréonine désaminase par des concentrations croissantes d'analogues structuraux de la L-isoleucine.

Essais suivant la méthode générale. 40 μ g/ml en protéines d'un extrait brut dialysé d'une souche dérégulée. Les analogues de la L-isoleucine sont essayés en présence d'une même concentration de L-thréonine 2×10^{-2} M. pH 8,0.

L-thréonine méthylester (CSS $\sim 5 \times 10^{-3}$ M) sont voisines de celles de la L-thréonine (CSS $\sim 2,5 \times 10^{-3}$ M) (Fig.4).

Les groupes de liaison participant à la fixation du substrat et de l'inhibiteur semblent donc spécifiques et distincts.

*
**

Une autre observation favorable à une interprétation de ce genre, mais ne permettant toujours pas d'argumenter plus avant notre choix, nous est fournie par l'analyse précise des cinétiques d'action d'analogues de la L-thréonine qui, bien que de structure très voisine, ne sont pas attaqués par l'enzyme (Tableau II).

On constate que certains d'entr'eux, par exemple l'allothréonine L- ou DL-, employés à des concentrations de l'ordre de grandeur de celle du substrat, c'est-à-dire à des concentrations beaucoup plus élevées que celles jusque là employées pour des analogues structuraux de la L-isoleucine, inhibent l'activité de l'enzyme.

TABLEAU II.

*Inhibition de la L-thréonine désaminase de biosynthèse
par des analogues structuraux de la L-thréonine.*

	Sans L-thréonine	Avec L-thréonine 2×10^{-2} M	p. 100 Inhibition
Sans analogue	—	100	—
D-thréonine 2×10^{-2} M	3,5	73	~ 30
DL-allothréonine 4×10^{-2} M	< 0,1	9,1	90,9
L-sérine 5×10^{-2} M	92,5	123	—
D-sérine 5×10^{-2} M	11	42	~ 69
O-méthyl DL-sérine 10^{-1} M	12	33	~ 79
O-benzyl L-sérine 10^{-2} M	< 0,1	103	—
DL- β -phényl sérine 2×10^{-2} M	< 0,1	95	5
L-homosérine 5×10^{-2} M	< 0,1	33,5	66,5

Mêmes conditions de mesure que pour le Tableau I.

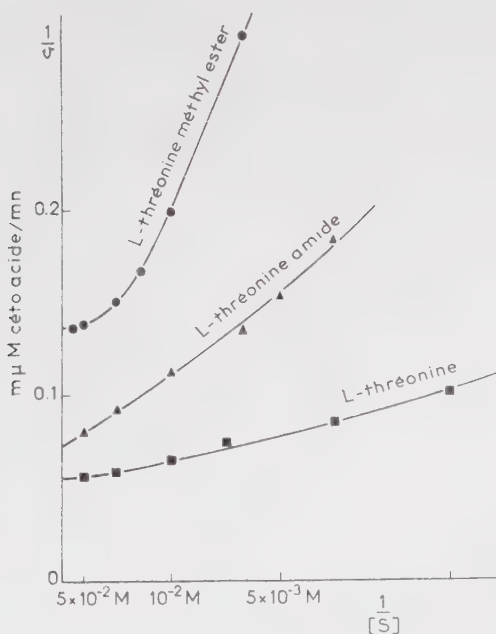


FIG. 4. — Courbe d'action de la L-thréonine désaminase sur de proches analogues structuraux de la L-thréonine.

Méthode générale de dosage. Chaque analogue a été mis en présence de la même concentration d'extrait brut dialysé d'une souche dérégulée : 40 μ g/ml en protéine.

Sur les figures 5 et 6 sont données quelques-unes des courbes d'inhibition obtenues soit avec la L-, soit avec la DL-allothréonine.

Celles-ci ont les caractères spécifiques de l'inhibition compétitive :

1°) les vitesses initiales mesurées en présence de concentrations croissantes de substrat avec et sans allothréonine tendent vers la même vitesse maximum ;

2°) à concentration élevée de substrat l'addition d'allothréonine à des concentrations de plus en plus grandes provoque une diminution des vitesses initiales qui tendent vers 0.

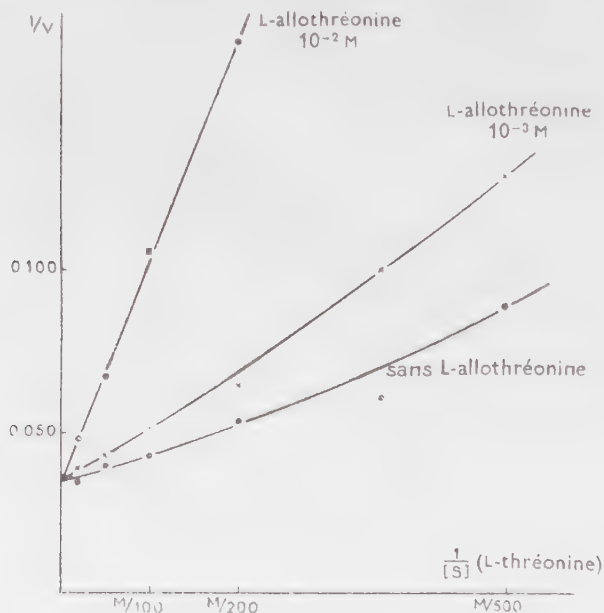


Fig. 5. Inhibition de la L-thréonine désaminase par la L-allothréonine en présence de concentrations croissantes de substrat.

Méthode générale de dosage : 40 $\mu\text{g/ml}$ en protéines d'un extrait brut dialysé d'une souche dérégulée. Coordonnées inverses (d'après CHANGEUX 37).

La comparaison des courbes d'inhibition par l'allothréonine et par la L-isoleucine fait ressortir une différence remarquable entre ces deux types d'inhibitions (Fig. 6) : les courbes d'inhibition tracées en portant l'inverse des vitesses initiales en fonction des concentrations croissantes d'allothréonine sont des droites alors que celles tracées en fonction des concentrations de L-isoleucine ne le sont pas. Des effets multimoléculaires caractérisent la loi d'action de la L-isoleucine. Au contraire la L-allothréonine affecte l'activité de la L-thréonine

désaminase en suivant les lois simples de l'inhibition compétitive (MICHAELIS et MENTEN [4], HALDANE [5]).

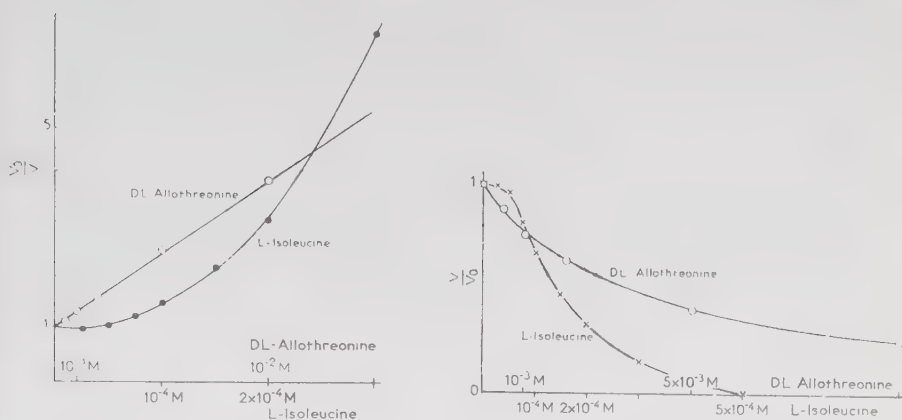


FIG. 6. — Comparaison de l'inhibition de la L-thréonine désaminase de biosynthèse par des concentrations croissantes de DL-alloisoleucine et de L-isoleucine.

Mêmes conditions que pour la figure 5 sauf L-thréonine 2×10^{-2} M.

Graphique de droite : coordonnées directes.

Graphique de gauche : l'inverse des vitesses initiales mesurées à des concentrations croissantes d'inhibiteur est porté en fonction des concentrations d'inhibiteur (en partie d'après CHANGEUX [2] [3]).

Compte tenu de l'étroite analogie de structure existant entre la L-thréonine et la L ou DL-alloisoleucine, on peut à juste titre penser que alloisoleucine et L-thréonine ont de l'affinité pour le récepteur actif de l'enzyme et qu'il y a exclusion réciproque par empêchement stérique de ces composés pour ce même récepteur.

L'effet de ces analogues, compétiteurs authentiques du substrat, souligne la singularité de l'effet de l'isoleucine et éloigne une fois de plus l'hypothèse suivant laquelle la L-isoleucine exclurait la L-thréonine par empêchement stérique.

II. — EFFETS DU pH SUR L'INHIBITION DE LA L-THRÉONINE DÉSAMINASE PAR L'ALLOISOLEUCINE ET LA L-ISOLEUCINE.

Une des prédictions les plus précises, bien que, une fois de plus, non exclusive, du modèle allostérique est que, si les surfaces réceptrices du substrat inhibiteur sont distinctes, il n'y a aucune raison pour que les propriétés de l'un et l'autre récepteur, si elles varient, varient dans le même sens. L'étude des effets du pH sur la réaction de désamination et sur la sensibilité de l'enzyme aux divers inhibiteurs permet de montrer que cette prédiction se réalise.

a) Effets du pH sur la réaction de désamination.

Il ressort des résultats obtenus avec la L-thréonine désaminase de biosynthèse d'*E. coli* K 12 (CHANGEUX [3] et Fig. 18) et de ceux obtenus par DAVIS et METZLER [6] avec la L-thréonine désaminase de foie de bœuf que la désamination enzymatique de la L-thréonine est sensible aux variations du pH. Dans chacun de ces cas, en effet, l'affinité apparente pour la L-thréonine varie considérablement entre pH 7 et pH 10 : peu élevée aux valeurs extrêmes, elle passe par un maximum à pH 9,5 ($CSS \sim 1,2 \times 10^{-3}$ M). Dans ces limites de pH l'activité moléculaire de la réaction ($= V_{max}$) par contre varie peu. La variation de l'affinité avec le pH a été mise en relation par DAVIS et METZLER avec l'état d'ionisation de la molécule de thréonine et plus particulièrement avec celui du groupe $\alpha-NH_2$ dont le pK d'ionisation est de 9,12 à 25° (GREENSTEIN et WINITZ [7]).

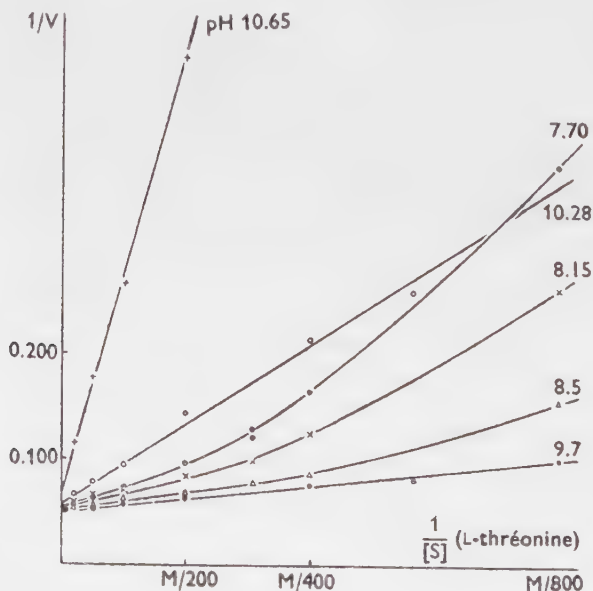


Fig. 7. — Effets du pH sur la cinétique d'action de la L-thréonine désaminase en fonction des concentrations de substrat.

Mêmes conditions que pour la figure 1 article II. Coordonnées inverses (d'après CHANGEUX [3]).

Dans le cas de l'enzyme de biosynthèse d'*E. coli*, l'action du pH sur l'affinité apparente s'accompagne aussi d'une action sur l'ordre de la réaction en fonction des concentrations de substrat. On sait qu'aux pH voisins de la neutralité, l'ordre de la réaction est nettement supérieur à l'unité, or il est clair sur la Fig. 7 et sur la Fig. 4 de l'article II,

qu'en passant de pH 7 à pH 9, l'effet multimoléculaire du substrat a disparu et qu'il ne réapparaît pas aux pH supérieurs à 9.

Il est séduisant d'imaginer, dans le cas de la L-thréonine désaminase de biosynthèse, que la corrélation entre la disparition des anomalies cinétiques et l'accroissement d'affinité, apparente entre pH 7 et pH 9, n'est pas fortuite et que celui-ci est la cause de celle-là. Nous verrons plus loin ce qu'il faut en penser.

b) Effets du pH sur l'inhibition par la L-isoleucine.

La disparition des anomalies cinétiques vis-à-vis du substrat s'accompagne aussi d'une modification des courbes d'inhibition de l'enzyme par la L-isoleucine (Fig. 8). Lorsque le pH s'élève les quantités

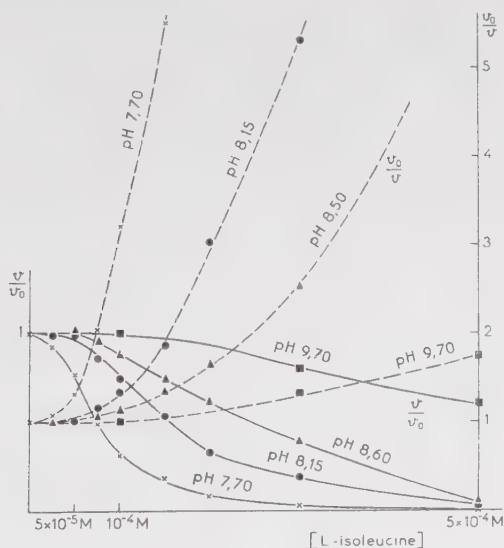


FIG. 8. — Effets du pH sur les courbes d'inhibition de la L-thréonine désaminase par la L-isoleucine.

Mêmes conditions que pour la figure 6, sauf pH.

d'isoleucine nécessaires pour obtenir une inhibition efficace deviennent très élevées. Tout en restant active sur son substrat la L-thréonine désaminase perd sa sensibilité à la L-isoleucine.

c) Effets comparés du pH sur l'inhibition par la L-isoleucine et par l'allothréonine.

Si l'on compare maintenant l'action inhibitrice des L- ou DL-allo-thréonine à celle de la L-isoleucine, il est clair (Fig. 9) que les pH

élevés affectent l'inhibition de l'enzyme par la L-isoleucine et très peu celle de l'enzyme par la DL-allothréonine.

Ce résultat et les précédents suggèrent que les affinités intrinsèques de l'enzyme vis-à-vis de la thréonine et de la L-isoleucine sont affectées d'une façon tout à fait différente par le pH. Cette proposition peut être directement démontrée en déterminant l'affinité intrinsèque de l'enzyme pour la L-isoleucine.

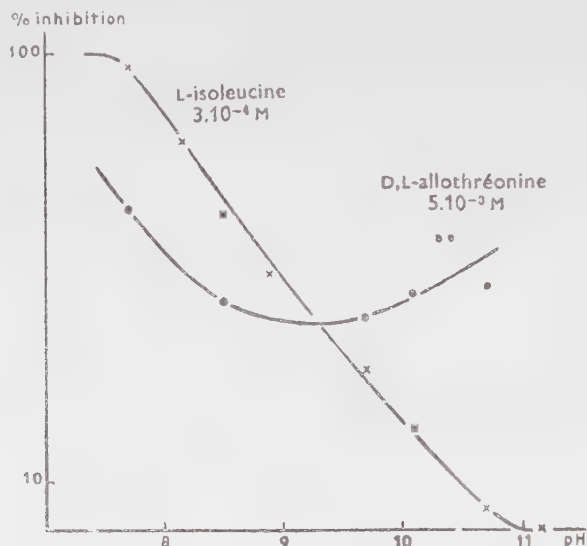


FIG. 9. — Effets comparés du pH sur l'inhibition de la L-thréonine désaminase de biosynthèse par la L-isoleucine et par la DL-allothréonine. Mêmes conditions que pour la figure 6 : L-thréonine 2×10^{-2} M (d'après CHANGEUX [3]).

La détermination de l'affinité intrinsèque de la L-thréonine désaminase pour la L-isoleucine repose sur l'observation déjà citée que la L-isoleucine protège l'enzyme contre l'inactivation thermique (CHANGEUX [1]).

Si l'on fait l'hypothèse que, dans les conditions où l'enzyme libre est instable, l'enzyme sous forme de complexe avec la L-isoleucine est stable, la mesure du taux d'inactivation à plusieurs concentrations de L-isoleucine permet la détermination de la constante de dissociation du complexe enzyme-isoleucine (EI), en l'absence de substrat. (voir légende fig. 10).

Les valeurs de la constante d'affinité ainsi déterminée dépendent du pH auquel est effectué l'inactivation : lorsque le pH s'accroît des pH voisins de 8 aux pH voisins de 9, l'affinité intrinsèque pour l'isoleucine diminue considérablement (Tableau III). Si l'on compare mainte-

nant le sens de cette variation au sens dans lequel varie l'affinité de l'enzyme pour la L-thréonine, on constate que l'affinité apparente de l'enzyme pour la L-thréonine, mesurée par les expériences de cinétique enzymatique, *s'accroît* dans les mêmes limites de pH : la constante de saturation du substrat passe d'une valeur voisine de 4×10^{-3} M à pH 7,7 à une valeur inférieure à 10^{-3} M à pH 9,7 (Fig. 7).

Les affinités intrinsèques de l'enzyme par la L-isoleucine et pour la L-thréonine ne varient donc pas de conserve en fonction du pH :

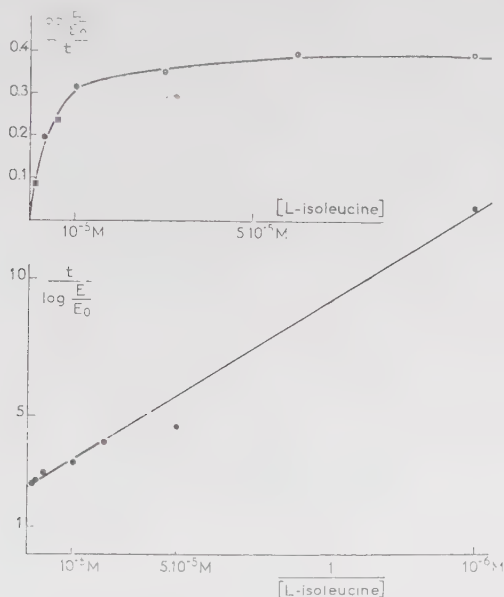


FIG. 10. - Détermination de l'affinité intrinsèque de la L-thréonine désaminase de biosynthèse pour la L-isoleucine par protection contre l'inactivation thermique en présence de concentrations croissantes de L-isoleucine.

L'extrait brut d'une souche déréprimée, dialysé en phosphate de potassium 1 M pH 8,2, est dilué 20 fois dans 2 ml d'eau distillée équilibrée à 27°C. L'activité enzymatique est essayée suivant la méthode générale sur des aliquotes prélevés au cours de l'inactivation. Les logarithmes des valeurs mesurées, portés en fonction du temps d'inactivation donnent des droites dont la pente varie avec les concentrations de L-isoleucine. A saturation en L-isoleucine, l'inactivation de l'enzyme pendant le temps de la mesure est négligeable. E_0 est la mesure de la quantité d'enzyme présent dans le milieu d'inactivation au temps t , en l'absence de L-isoleucine. E_t est la même mesure effectuée en présence d'une concentration donnée de L-isoleucine. Si E_1 est la mesure de la quantité d'enzyme présent au début de l'expérience, on a

$$E_t = E_1 (1 - e^{-k_1 t})$$

$\bar{y}$ étant la fraction de saturation de l'enzyme par la L-isoleucine.

Dans ces conditions
$$\frac{\log \frac{E_t}{E_0}}{t} = k_1 \bar{y}.$$

TABLEAU III.

Effet du pH sur l'affinité intrinsèque pour la L-isoleucine de la L-thréonine désaminase de biosynthèse.

pH	K _D
8,2	$4,6 \times 10^{-6}$ M
9,8	$6,7 \times 10^{-5}$ M

Même méthode que celle décrite dans la légende de la Figure 10.

au contraire elles évoluent en sens opposé dans les limites de pH considérées.

Ces résultats, comme les précédents, ne sont pas directement prévus par le modèle suivant lequel les surfaces réceptrices de la L-thréonine et la L-isoleucine seraient pour une grande part mises en commun ; ils sont par contre tout à fait en faveur de la *distinction intégrale des groupes de liaisons respectivement spécifiques de la L-thréonine et de la L-isoleucine*, proposition essentiellement du modèle « *allostérique* ».

III. — EFFETS ANTAGONISTES DE LA L-ISOLEUCINE ET DE QUELQUES-UNS DE SES ANALOGUES.

Les faits jusque là présentés établissent assez clairement que les *groupes de liaison* assurant la formation des complexes de l'enzyme avec la L-thréonine et la L-isoleucine sont, pour une grande part, distincts et spécifiques. Ils ne sont pas suffisants, nous l'avons dit, pour démontrer que les *surfaces réceptrices* (ou récepteurs) ne sont pas chevauchantes ni même suffisamment voisines pour permettre une interaction directe entre l'inhibiteur et le substrat.

Les effets de plusieurs analogues de la L-isoleucine, en particulier les antagonistes de son action inhibitrice, nous permettront de franchir ce pas et de conclure que l'interaction hétérotrope est bien une interaction indirecte, c'est-à-dire « *allostérique* ».

*
**

Si les aires réceptrices de la L-isoleucine et de la L-thréonine sont topographiquement distinctes, peuvent exister parmi les analogues de la L-isoleucine des composés qui sont à celle-ci, ce que l'allo-thréonine est à la thréonine, c'est-à-dire des compétiteurs de la L-isoleucine pour son récepteur spécifique. De tels composés ne seraient pas des inhibiteurs de l'enzyme ; mis en présence de la L-isoleucine, ils lèveraient l'effet inhibiteur de celle-ci.

Sur le Tableau IV et la Fig. 11 sont représentés les résultats d'une série d'expériences où ont été essayés divers analogues de la L-isoleu-

TABLEAU IV.

Action de divers analogues structuraux de la L-isoleucine sur l'inhibition de la L-thréonine désaminase par la L-isoleucine.

	Pas de L-iso-leucine	L-iso-leucine 2×10^{-4} M	P. 100 inhibition
Pas d'effecteur	1,000	170	83
L-norleucine 10^{-2} M	980	815	17
L-valine 10^{-2} M	940	650	31
L- α -aminobutyrate 10^{-2} M	920	590	36
L-méthionine 10^{-2} M	1,010	415	54
L-alanine 10^{-2} M	1,000	225	78
L-norvaline 10^{-2} M	760	160	79
Glycine 10^{-2} M	980	190	80,5
L-leucine 10^{-2} M	700	120	83
L-isoleucine amide HCl 10^{-2} M	970	150	84,5
D-isoleucine 10^{-2} M	1,000	145	85,5
N-chloracétyl DL-isoleucine 2×10^{-3} M	830	62	93
N-chloracétyl L-valine 10^{-2} M	800	76	91

Mêmes conditions que pour le Tableau I. Les effecteurs sont essayés en présence d'une concentration constante de L-thréonine (2×10^{-2} M) (d'après CHANGEUX [2]).

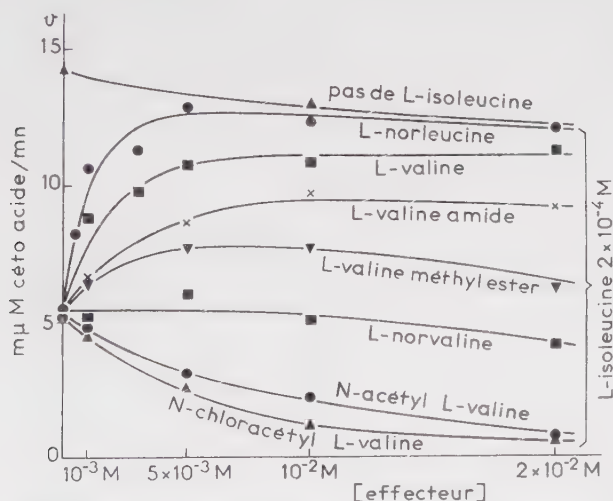


FIG. 11. Effet de quelques analogues de la L-isoleucine sur l'inhibition de la L-thréonine désaminase de biosynthèse par la L-isoleucine en présence d'une concentration constante de L-thréonine (2×10^{-2} M) et de L-isoleucine (2×10^{-4} M).

Méthode générale de dosage : pH 8,1 ; 45 μ g/ml d'un extrait brut dialysé d'une souche dérèprimée. En l'absence de L-isoleucine chacun des composés essayés n'inhibe pas l'activité désaminasique de plus de 20 p. 100.

cine en présence de L-isoleucine. Ceux-ci se répartissent en catégories assez nettement définies. La L-norleucine, la L-valine sont les chefs de file d'une série d'acides aminés à chaîne aliphatique saturée et symétrique qui, sans avoir d'action inhibitrice sur l'enzyme restaurent l'activité de la L-thréonine désaminase inhibée par la L-isoleucine. D'autre part, il existe une série d'analogues, parmi ceux-ci la L-leucine, qui, dans les conditions expérimentales utilisées, n'ont aucun effet antagoniste de la L-isoleucine, et dont l'effet inhibiteur s'ajoute à celui de la L-isoleucine. Il en existe même deux : la N-chloracétyl-L-isoleucine et la N-chloracétyl-DL-valine qui, mis en présence de L-isoleucine, provoque une inhibition supérieure à la somme des inhibitions obtenues avec chacun de ces composés pris individuellement. Parmi ces analogues s'en trouvent donc, la L-norleucine, la L-valine par exemple, qui, en présence de substrat, réactivent l'enzyme inhibé par la L-isoleucine, donc *excluent la L-isoleucine de son récepteur sans pour cela diminuer l'affinité du récepteur actif pour la L-thréonine*. Il n'est pas possible d'interpréter ce simple fait sans poser au préalable que les récepteurs du substrat et de la L-isoleucine sont intégralement distincts.

Ce fait est, de plus, suffisant pour *exclure l'éventualité d'interactions directes*. En effet, les molécules de L-isoleucine et de L-norleucine ou de L-valine possèdent des chaînes aliphatiques de structure très voisine, il est difficile d'imaginer que les deux derniers de ces aminoacides puissent établir avec le substrat des interactions directes de nature différente de celles qui, dans cette hypothèse, se manifesteraient entre la L-isoleucine et la L-thréonine. Tout s'accorde donc pour dire que l'interaction hétérotrope est une interaction *indirecte*.



Les faits les plus probants nous sont fournis par l'analyse cinétique de l'antagonisme L-isoleucine - L-valine qui révèle une situation beaucoup plus complexe que ne le laisserait prévoir l'antagonisme compétitif pour un même récepteur.

1) Si l'interaction entre la L-valine ou la L-norleucine et la L-isoleucine était directe, on devrait s'attendre à ce que l'addition de concentrations croissantes de L-valine ou de L-norleucine assure une restauration de l'activité enzymatique inhibée par la L-isoleucine jusqu'à des valeurs très voisines de l'activité observée en l'absence de L-isoleucine. Or si à pH 8,1 on trace des courbes de ce genre (Fig. 12 et Fig. 13), il est clair que, aux concentrations saturantes de L-valine ou de L-norleucine, il n'est plus possible de retrouver le niveau d'activité mesuré en l'absence de L-isoleucine et les maxima de réactivation obtenus dépendent des concentrations de L-isoleucine. Il existe donc des conditions dans lesquelles se trouve mis en évidence le caractère *non compétitif* de l'antagonisme L-valine - L-isoleucine,

2) Dans l'hypothèse d'une interaction directe, il n'y aurait pas lieu non plus de penser que la L-valine ou la L-norleucine puissent avoir

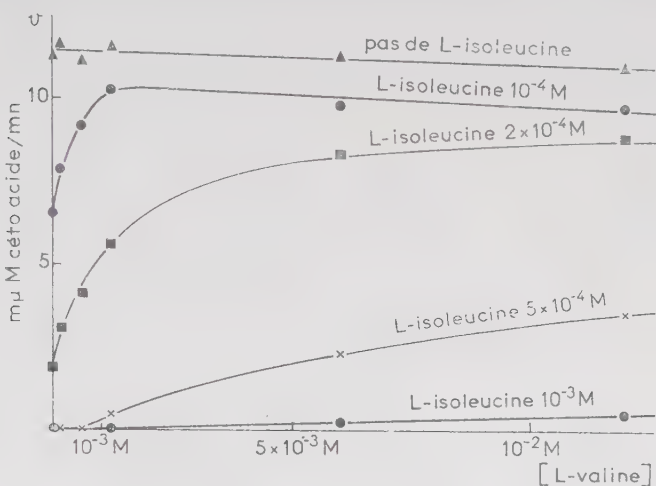


FIG. 12. -- Effets antagonistes de la L-valine et de la L-isoleucine sur la L-thrénine désaminase de biosynthèse en présence d'une concentration constante de L-thrénine (2×10^{-2} M).

Mêmes conditions que pour la figure 11 (en partie d'après CHANGEUX [3]).

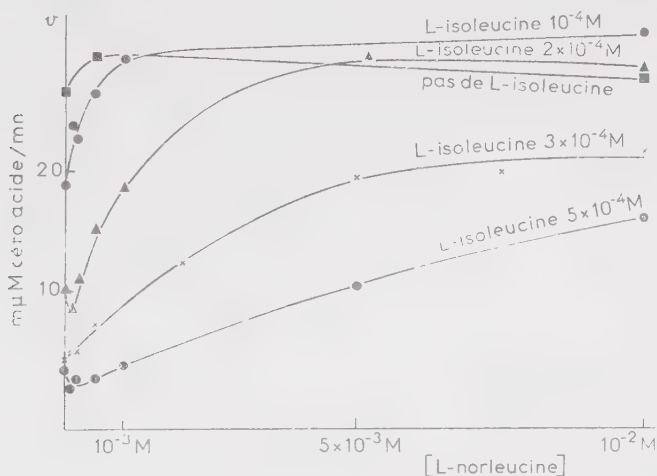


FIG. 13. — Effets antagonistes de la L-norleucine et de la L-isoleucine sur la L-thrénine désaminase de biosynthèse en présence d'une concentration constante de la L-thrénine (2×10^{-2} M).

Méthode générale de dosage, pH 7,7, 12 μ g/ml d'une préparation d'enzyme partiellement purifiée.

un effet quelconque sur l'activité de l'enzyme en l'absence de L-isoleucine. Or, la L-valine et la L-norleucine ont un effet *activateur* sur l'enzyme en l'absence de L-isoleucine. Cet effet (Fig. 14 et Fig. 15) est

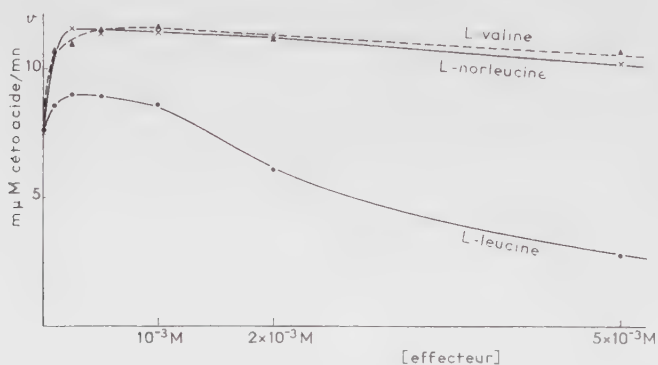


FIG. 14. — Effet des concentrations croissantes de L-valine, L-norleucine et L-leucine sur l'activité de la L-thréonine désaminase en présence d'une concentration constante de L-thréonine (2×10^{-3} M).

Essais suivant la méthode générale sauf pour les concentrations en substrat et en effecteurs ; 29 μ g/ml en protéines d'une fraction purifiée 10 fois (d'après CHANGEUX [2]).

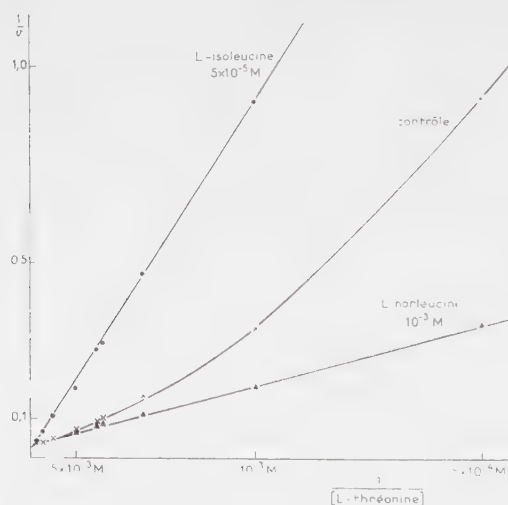


FIG. 15. — Effets de la L-norleucine et de la L-isoleucine sur la cinétique d'action sur la L-thréonine de la L-thréonine désaminase de biosynthèse d'une fraction partiellement purifiée.

Essai dans les conditions suivantes : citrate de sodium pH 8,3 10^{-1} M ; 5 μ g de phosphate de pyridoxal ; 12 μ g en protéine d'une fraction purifiée 13 fois à partir d'un extrait de souche déréprimée. Volume total 1,0 ml. Température : 27°C. Effecteurs aux concentrations indiquées.

présent aux faibles concentrations de substrat et dans les conditions où les cinétiques d'ordres supérieurs en fonction du substrat sont constatées ; il porte avant tout sur l'affinité de l'enzyme pour la L-thréonine.

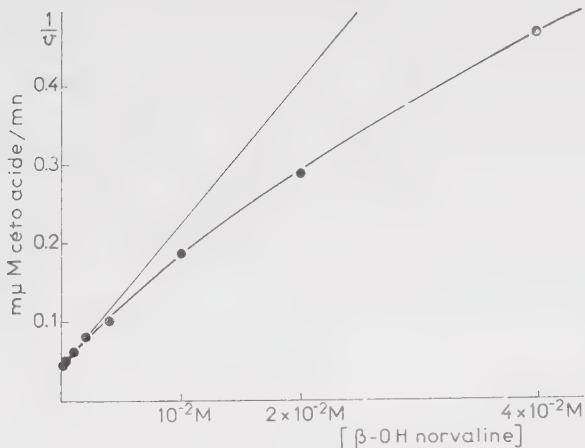
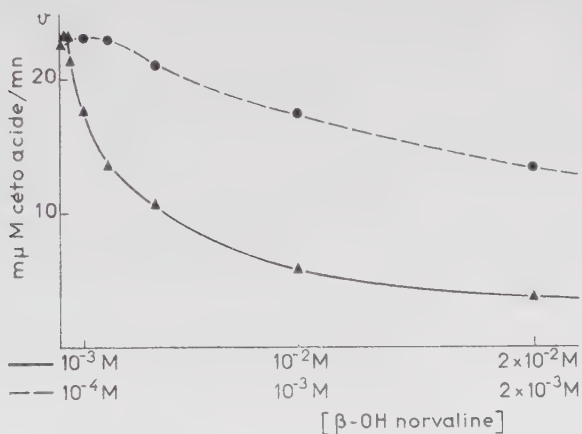


FIG. 16. — Action de la β -OH norvaline sur l'activité de la L-thréonine désaminase.

Essais suivant la méthode générale pH 8,1, 45 μg d'un extrait brut dialysé d'une souche déréprimée.

Graphique du haut : coordonnées directes.

Graphique du bas : l'inverse des vitesses initiales mesurée à des concentrations croissantes de β -OH norvaline est porté en fonction des concentrations de β -OH-norvaline.

La conclusion la plus évidente de ce groupe d'observations est que l'interaction L-valine (ou L-norleucine) - L-isoleucine est indirecte et qu'il existe non plus deux mais *trois* catégories de récepteurs distincts : en plus du récepteur d'*inhibition* spécifique de la L-isoleucine (CHANGEUX [1]) et du récepteur *actif*, un récepteur d'*activation* fixant L-norleucine et L-valine (MONOD, et al. [8]).

*
**

Notons en outre que ces résultats et interprétations permettent de comprendre les effets complexes de composés dont la formule est intermédiaire entre celle de la L-thréonine et celle de la L-isoleucine.

Par exemple la L-leucine mise en présence d'une concentration peu élevée et constante de substrat (Fig. 14) agit comme un activateur aux faibles concentrations, comme un inhibiteur aux fortes concentrations. L'un et l'autre de ces effets disparaissent lorsque la sensibilité à la L-isoleucine est supprimée (cf. Article IV) ; cet acide aminé a donc très vraisemblablement de l'affinité à la fois pour le récepteur d'activation et pour le récepteur d'inhibition.

La β *Hydroxy-norvaline* a une structure moléculaire qui participe à la fois de la structure du substrat, puisque β hydroxy-aminoacide, et de la structure d'un activateur, puisque avec une chaîne linéaire aliphatique. Les courbes d'inhibition obtenues avec ce composé sont, là encore « hybrides » (Fig. 16) et s'expliquent vraisemblablement parce que cet aminoacide peut se fixer à la fois sur le récepteur actif et sur le récepteur d'activation.

IV. — CONCLUSIONS.

L'action des analogues structuraux de la L-thréonine et de la L-isoleucine sur l'activité de la L-thréonine-désaminase, qui a permis de souligner la double spécificité de la molécule, la variabilité en sens opposé de l'affinité de l'enzyme en fonction du pH pour la L-thréonine et la L-isoleucine, l'existence d'analogues de la L-isoleucine (L-norleucine, L-valine) qui sont antagonistes de la L-isoleucine et activateurs efficaces de l'enzyme, obligent à interpréter l'interaction hétérotrope (L-thréonine-L-isoleucine) comme une interaction *allostérique*. L'interaction régulatrice n'est la conséquence ni d'une parenté structurale, ni d'une réactivité spéciale des molécules de substrat et d'effecteur régulateur : elle est *indirecte* et s'établit entre récepteurs spécifiques topographiquement distincts.

*
**

Il est remarquable que les observations décrites à propos de la L-thréonine désaminase de biosynthèse ont pu être retrouvées à propos d'enzymes qui, mis à part leur rôle régulateur, n'ont aucune analogie fonctionnelle avec elle.

Parmi ceux-ci on compte plusieurs exemples d'enzymes dont l'antagonisme entre l'effecteur régulateur et le substrat se présente cinétiquement comme principalement compétitif. Dans chacun de ces cas la mise en évidence d'antagonistes de l'inhibiteur régulateur, qui sont aussi des activateurs de l'enzyme en son absence, exclut l'hypothèse d'un empêchement stérique entre l'effecteur régulateur et le substrat. En voici quelques exemples :

aspartate transcarbamylase : inhibiteur CTP ; activateur ATP (GERHART et PARDEE [9, 10, 11]) ;
 désoxycytidylate amino hydrolase : inhibiteur dTTP ; activateur dCTP (SCARANO et al. [12]) ;
 phosphofructokinase : inhibiteur ATP ; activateur 3'-5' AMP (MANSOUR [13]) PASSONEAU et LOWRY [14] ;
 homosérine déshydrogénase de *Rhodospirillum rubrum* : inhibiteur L-thréonine ; activateurs L-isoleucine et L-méthionine (STURANI et al. [15]) ;
 DPN-isocitrate déshydrogénase de *Neurospora crassa* : inhibiteur α -cétaglutarate ; activateur citrate (SANWALL et al. [16]) ;
 désoxythymidine kinase : inhibiteur dTTP ; activateur dCDP (OKAZAKI et KORNBERG [17]) ;
 phosphorylase b : inhibiteur ATP ; activateur AMP (MADSEN [18]) etc...

De plus, à côté des enzymes régulateurs qui, comme ceux précédemment cités, font l'objet d'effets principalement « compétitifs » de la part des effecteurs régulateurs (nous les appellerons désormais *Systèmes K*), il en existe pour lesquels l'effecteur régulateur affecte principalement l'activité moléculaire (*Système V*) ; ce sont par exemple : l'homosérine déshydrogénase de *E. coli* (PATTE et al [19], COHEN et PATTE [20]), la lysine-aspartokinase de *E. coli* (STADTMAN et al. [21]), l'ATP-PRPP pyrophosphorylase (MARTIN [22]) etc... Il va de soi que, pour les enzymes de ce groupe, l'antagonisme « non compétitif » effecteur-substrat fait partie des effets indirects.

Il ne semble donc pas exister d'exception au fait que les interactions régulatrices élémentaires au niveau enzymatique, telles qu'elles ont été décrites jusqu'à ce jour, (du moins chez les bactéries), entrent dans la catégorie des interactions allostériques.



Nous ne pourrions pas clore ce chapitre sans souligner que les conclusions qui viennent d'être formulées reposent uniquement sur des données cinétiques qui, à elles seules, ne permettent pas et ne permettront jamais une démonstration *rigoureuse* des propositions allostériques. A notre connaissance il n'existe qu'un seul exemple pour lequel la démonstration directe a été faite : celui de la molécule d'hémoglobine. Par les méthodes de diffraction des rayons X, PERUTZ et

al. [23] ont, en effet, montré que les 4 hèmes de la molécule ne sont pas contigus mais, au contraire, distants les uns des autres d'environ 30 Å ce qui est considérable à l'échelle de la molécule. Les interactions d'affinité homotropes de l'oxygène sont nécessairement *indirectes* : la molécule d'hémoglobine se présente comme un *prototype* de molécule allostérique.

RÉSUMÉ.

1. Les exigences structurales requises pour qu'un composé soit actif comme substrat ou comme inhibiteur sont profondément différentes ; cette observation ainsi que la mise en évidence d'une authentique inhibition compétitive de l'enzyme par un proche analogue du substrat, l'allothréonine, souligne la double spécificité de la molécule de L-thréonine désaminase.

2. Les affinités de l'enzyme pour la L-thréonine et la L-isoleucine varient indépendamment avec le pH. C'est là une preuve que des groupes de liaison distincts interviennent respectivement dans l'association de la L-thréonine et de la L-isoleucine.

3. Divers analogues structuraux de la L-isoleucine : la L-valine, la L-norleucine... se comportent *in vitro* comme des antagonistes de la L-isoleucine. Ce sont aussi des activateurs de l'enzyme en l'absence de L-isoleucine. Ils se fixent sur un récepteur distinct du récepteur du substrat.

L'inhibition de la L-thréonine désaminase par la L-isoleucine n'est pas due à une exclusion directe du substrat par l'inhibiteur, mais à une interaction indirecte entre récepteurs distincts et spécifiques (interaction « *allostérique* »).

SUMMARY.

1°) The structural features which determine whether a compound is active as substrate or inhibitor are very different. This observation together with the demonstration of a true competitive inhibition of the enzyme by allothreonine, a close analogue of the substrate, emphasises the double specificity of the L-threonine deaminase.

2°) The affinities of the enzyme for L-threonine and L-isoleucine vary independently with pH. This observation shows that different binding groups are involved in the association with L-threonine and L-isoleucine.

3°) Various structural analogues of L-isoleucine : L-valine, L-norleucine... behave *in vitro* as antagonists of L-isoleucine. In addition, in the absence of L-isoleucine, they behave as activators of the enzyme. Hence they binds at a site distinct from the substrate binding site.

The inhibition of L-threonine deaminase by L-isoleucine is not the result of direct exclusion of the substrate by the inhibitor but is caused by an indirect interaction between distinct and specific binding sites (allosteric interaction).

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Strukturbedürfnisse, die für die Wirksamkeit einer Verbindung als Substrat oder als Inhibitor erforderlich sind, sind grundverschieden ; diese Beobachtung sowie der Nachweis einer tatsächlichen kompetitiven Inhibition des Enzyms durch ein nahverwandtes Analog des Substrats, das Allo-threonin, betont die doppelte Spezifität des L-Threonin-Deaminase-Moleküls.

2. Die Affinitäten des Enzyms für das L-Threonin und das L-Isoleucin wechseln voneinander unabhängig mit dem pH. Dies ist der Beweis dafür, dass die Bindungsgruppen für die Assoziation mit L-Threonin bzw. L-Isoleucin verschieden sind.

3. Verschiedene Struktur-Analoge des L-Isoleucins : das L-Valin, das L-Norleucin,... verhalten sich *in vitro* als Antagonisten des L-Isoleucins. Sie sind auch Aktivatoren des Enzyms in der Abwesenheit des L-Isoleucins. Sie binden sich an einen Rezeptor, der vom Substrat-Rezeptor verschieden ist.

Die Inhibition der L-Threonin-Deaminase durch L-Isoleucin wird nicht durch eine direkte Ausschliessung des Substrats durch den Inhibitor verursacht, sondern durch eine indirekte Interaktion zwischen verschiedenen und spezifischen Rezeptoren (« allosterische » Interaktion).

BIBLIOGRAPHIE.

1. CHANGEUX, J. P. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1961, **26**, 313.
2. CHANGEUX, J. P. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1963, **28**, 497.
3. CHANGEUX, J. P. — *J. Mol. Biol.*, 1962, **4**, 220.
4. MICHAELIS, L. et MENTEN, M. L. — *Biochem. Z.*, 1913, **49**, 333.
5. HALDANE, J. B. S. — « *Enzymes* » Longmans, Green, New York, 1930.
6. DAVIS, L. et METZLER, R. — *J. Biol. Chem.*, 1962, **237**, 1883.
7. GREENSTEIN, J. P. et WINITZ, M. — « *Chemistry of the aminoacids* », vol. 1, John Wiley and Sons, New York.
8. MONOD, J., CHANGEUX, J. P. et JACOB, F. — *J. Mol. Biol.*, 1963, **6**, 306.
9. GERHART, J. C. et PARDEE, A. B. — *J. Biol. Chem.*, 1962, **237**, 891.
10. GERHART, J. C. et PARDEE, A. B. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1963, **28**, 491.
11. GERHART, J. C. et PARDEE, A. B. — *Fed. Proc. Symp.*, (sous presse), 1963.
12. SCARANO, E., GERACI, G., POLZELLA, A. et CAMPANILE, E. — *J. Biol. Chem.*, 1963, **238**, PC 1556.
13. MANSOUR, T. E. — *J. Biol. Chem.*, 1963, **238**, 2285.
14. PASSONEAU, J. et LOWRY, O. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1962, **7**, 10.
15. STURANI, E., DATTA, F., HUGUES, M. et GEST, H. — *Science*, 1963, **141**, 1053.
16. SANWAL, B., ZINK, M. et STACHOW, C. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1963, **12**, 510.
17. OKAZAKI, R. et KORNBERG, A. — *J. Biol. Chem.*, 1964, **239**, 269.
18. MADSEN, N. B. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1964, **15**, 390.
19. PATTE, J. C., LE BRAS, G., LOVINY, T. et COHEN, G. N. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1963, **67**, 16.
20. COHEN, G. N. et PATTE, J. C. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1963, **28**, 513.
21. STADTMAN, E. R., COHEN, G. N., LE BRAS, G. et DE ROBICHON SZULMAJSTER, H. — *J. Biol. Chem.*, 1961, **236**, 2033.
22. MARTIN, R. G. — *J. Biol. Chem.*, 1962, **237**, 257.
23. PERUTZ, M. F., ROSSMANN, M. G., CULLIS, A. F., MUIRHEAD, H., WILL, G. et NORTH, A. C. T. — *Nature*, 1960, **185**, 416.



Imprimerie M. Declume, Lons-le-Saunier.

SUR LES PROPRIÉTÉS ALLOSTÉRIQUES DE LA L-THRÉONINE DÉSAMINASE DE BIOSYNTHÈSE.

IV. — LE PHÉNOMÈNE DE DÉSENSIBILISATION.

par Jean-Pierre CHANGEUX.

Institut Pasteur, Service de Biochimie cellulaire.

(Mémoire reçu le 10 juin 1964).

L'analyse des cinétiques complexes de la L-thréonine-désaminase de biosynthèse, présentée dans des articles précédents (*), nous a amené à conclure qu'il existe, par molécule d'enzyme, plusieurs récepteurs du substrat et plusieurs récepteurs de l'inhibiteur de contrôle. L'analyse de l'action des analogues de la L-isoleucine nous a permis, de plus, de démontrer que les récepteurs du substrat et de l'inhibiteur de contrôle sont topographiquement distincts et que l'interaction régulatrice élémentaire L-thréonine - L-isoleucine est indirecte, c'est-à-dire allostérique. Sachant aussi que les interactions homotropes ne peuvent être interprétées autrement que comme des interactions indirectes, nous sommes conduits maintenant à étudier le mécanisme de la transmission de ces interactions

1. — Si la transmission des interactions allostériques s'effectue par l'intermédiaire de la molécule protéique, il est possible que, en altérant discrètement la structure de la L-thréonine-désaminase, on interfère avec cette transmission et par exemple que l'on obtienne des préparations d'enzyme qui, tout en ayant conservé l'activité désaminasique, aient perdu la sensibilité à l'effet inhibiteur de la L-isoleucine (phénomène de « désensibilisation »). Nous décrirons, dans ce chapitre les conditions qui nous ont permis d'aboutir à ce résultat.

2. — Dès lors, l'analyse du processus de désensibilisation doit nous permettre de choisir entre deux mécanismes plausibles de transfert des interactions allostériques :

1°) les interactions homotropes sont de nature différente des interactions hétéotropes et les structures mises en jeu par leur transmission sont intégralement distinctes ;

(*) Sur les propriétés allostériques de la L-thréonine désaminase de biosynthèse, I, II et III. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1964, **46**, 927-961 et **46**, 1151-1173.

2°) les interactions homotropes et les interactions hétérotropes relèvent d'un seul et même mécanisme dépendant de l'organisation générale de la molécule protéique.

La première de ces hypothèses prédit qu'il est possible que, par un moyen adéquat, on altère *sélectivement* les interactions homotropes ou les interactions hétérotropes.

Une prédiction très précise de la seconde est, au contraire, que si l'on touche aux unes on doit nécessairement modifier les autres.

Les faits présentés au cours de ce chapitre seront d'abord relatifs à la description du phénomène de désensibilisation et à son interprétation comme altération discrète de la structure de l'enzyme : la molécule protéique sera rendue responsable de la transmission des interactions allostériques.

Puis l'analyse des propriétés cinétiques de diverses fractions d'enzymes désensibilisées nous permettra de démontrer que la seconde des deux hypothèses qui viennent d'être formulées est vérifiée par l'expérience : les divers types d'interactions allostériques mettent en jeu un mécanisme *unique* dépendant de l'architecture générale de la molécule.

I. — TECHNIQUES DE DÉSENSIBILISATION.

Vers la fin de l'année 1959, nous observions que la L-thréonine désaminase d'un extrait brut d'*E. coli*, servant de témoin dans les expériences en cours, avait perdu sa sensibilité à la L-isoleucine sans avoir pour autant perdu d'activité. Cette observation a été depuis reproduite dans un grand nombre de conditions différentes (CHANGEUX [1, 2, 3]). Deux catégories d'effets peuvent être distingués : les effets directement réversibles qui dépendent des conditions du dosage de l'activité désaminasique et les effets irréversibles menant à une altération permanente de l'enzyme.

a) Effets réversibles.

Dans un précédent chapitre nous avons insisté sur le fait que, suivant la valeur du pH auquel sont effectuées les mesures d'activité, la sensibilité de la L-thréonine désaminase à l'inhibition par la L-isoleucine est plus ou moins apparente. Nous avons en particulier souligné que, aux pH alcalins, l'activité désaminasique n'est plus sensible à la L-isoleucine et que la molécule perd son affinité pour la L-isoleucine dans une zone de pH où l'affinité pour le substrat s'accroît.

Divers autres paramètres du milieu de dosage sont susceptibles d'influer, eux aussi, sur la révélation de l'effet inhibiteur de la L-isoleucine. L'accroissement de la force ionique du milieu de dosage agit dans

le même sens que les pH alcalins. La présence d'éthylène glycol (10 p. 100 ou 20 p. 100 v/v dans le milieu de dosage) au contraire sensibilise à l'action inhibitrice de la L-isoleucine (Fig. 1). A basse température (11° C) il faut relativement moins de L-isoleucine pour obtenir le même pourcentage d'inhibition qu'à 37° C (Fig. 1).

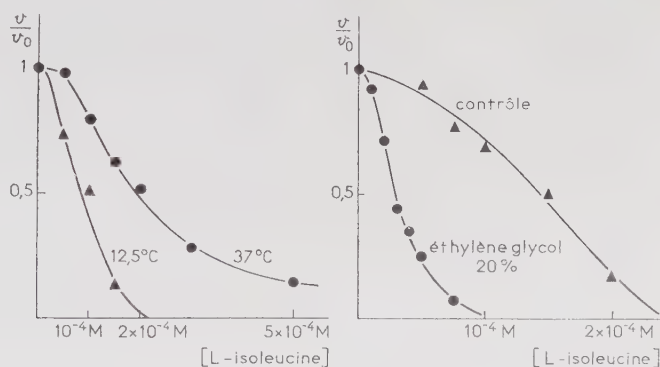


FIG. 1. — Action de l'éthylène glycol et de la température sur la courbe d'inhibition de la L-thréonine désaminase par la L-isoleucine.

Essai suivant la méthode générale en présence d'une concentration constante de L-thréonine ($2 \times 10^{-2} M$) ; 45 $\mu g/ml$ d'un extrait brut dialysé d'une souche déréprimée.

Graphique de gauche : courbes d'inhibition par la L-isoleucine à 12,5° C et 37° C.

Graphique de droite : la température est maintenue à 27° C. L'éthylène glycol est en solution à 20 p. 100 dans le milieu de dosage.

Tous ces effets sont intégralement et instantanément réversibles : par exemple une préparation de L-thréonine désaminase amenée à pH 9 ou mise en présence de forces ioniques élevées retrouve instantanément ses propriétés originales lorsqu'elle est ramenée dans les conditions initiales.

b) Effets irréversibles.

a) Purification de l'enzyme.

A côté des effets qui viennent d'être décrits il en est qui aboutissent à une désensibilisation partielle ou totale mais *stable* de l'enzyme. Il est particulièrement important que parmi eux se trouvent certaines des conditions habituelles de fractionnement. C'est ainsi que les premières tentatives de purification de la L-thréonine désaminase (CHANGEUX 1961) effectuées en l'absence des protecteurs spécifiques utilisés

depuis (cf article I) ont conduit à des préparations d'enzyme irréversiblement modifiées (*) ayant en particulier perdu une partie de leur sensibilité à la L-isoleucine.

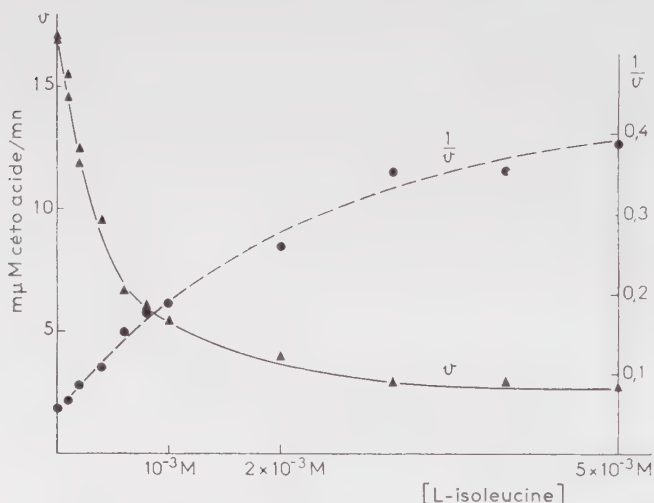


FIG. 2. — Inhibition par des concentrations croissantes de L-isoleucine de la L-thréonine désaminase de biosynthèse d'une préparation fractionnée en l'absence de protecteurs spécifiques.

Essai suivant la méthode générale. pH 8,0. L-thréonine 2×10^{-2} M. La préparation utilisée a été fractionnée par le sulfate d'ammonium et traitée par un gel de phosphate en l'absence de L-isoleucine et de phosphate de pyridoxal. Concentration d'enzyme : 20 μ g/ml en protéines. *Courbe en trait plein* : coordonnées directes ; *courbe en traits tirés* : coordonnées inverses (en partie d'après CHANGEUX [1]).

β) Traitement thermique.

Le premier procédé que nous avons reconnu mener à une désensibilisation totale et irréversible de la L-thréonine désaminase consiste à porter une préparation d'enzyme à 55° C en présence de phosphate

(*) Voici par exemple les propriétés cinétiques de l'une des fractions obtenues :

1) les courbes d'inhibition par des concentrations croissantes en L-isoleucine (Fig. 2) ne sont pas sigmoïdes et à saturation en inhibiteur, les vitesses mesurées en présence d'une concentration donnée de L-thréonine (2×10^{-2} M) ne tendent pas vers zéro mais vers une vitesse limite ;

2) les mesures cinétiques portées dans le système de coordonnées de LINEWEAVER et BURK donnent des droites qui concourent ni sur l'axe des ordonnées ni sur celui des abscisses (Fig. 3).

L'inhibition par la L-isoleucine de cette fraction enzymatique n'est donc plus de type compétitif. Mais le point essentiel de cette observation est que à saturation en L-isoleucine l'enzyme est encore actif. Il n'est pas pour l'instant possible de dire si l'activité résiduelle mesurée à saturation d'inhibiteur représente ou non une fraction de molécules totalement désensibilisées, c'est-à-dire si la préparation est homogène ou non.

de potassium 1 M pH 8. L'expérience est représentée sur la fig 4. Après équilibration à 55° C des aliquotes sont prélevés à des temps variés et brutalement refroidis à 0° C. L'activité désaminasique est dosée en présence et en l'absence de L-isoleucine. Il n'y a pas de perte d'acti-

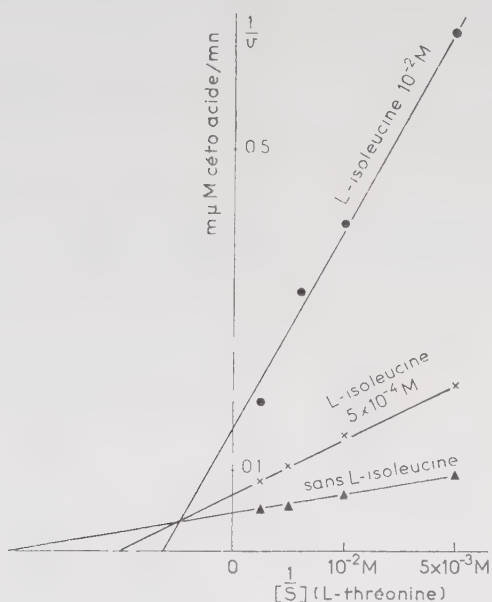


FIG. 3. — Inhibition par la L-isoleucine de la L-thréonine désaminase de biosynthèse d'une préparation fractionnée en l'absence de protecteurs spécifiques. Mêmes conditions que pour la fig. 1.

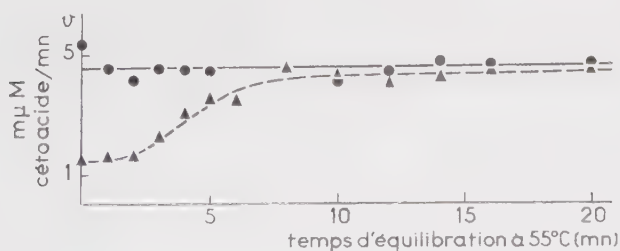


FIG. 4. — Cinétique de désensibilisation d'une préparation partiellement purifiée de L-thréonine désaminase par incubation à 55° C. La préparation partiellement purifiée en l'absence de protecteurs spécifiques est dialysée puis équilibrée à 55° C pour le temps indiqué en présence de phosphate de sodium 1 M, pH 8,2, à raison de 0,25 mg de protéine/ml. L'activité enzymatique est dosée après refroidissement brutal à 0° C suivant la méthode générale, à 27° C, en présence de L-isoleucine 10⁻² M (courbe en traits tirés) et en l'absence d'inhibiteur (courbe en trait plein); la concentration de L-thréonine est maintenue constante (2 × 10⁻² M) (d'après CHANGEUX [1]).

tivité malgré l'élévation de température mais progressivement la sensibilité à la L-isoleucine disparaît ; elle a complètement disparu après 10 minutes de traitement (moins de 10 p. 100 d'inhibition en présence de L-isoleucine 10^{-2} M et de L-thréonine 2×10^{-2} M). Le phénomène n'est facilement reproduit que si l'extrait utilisé a été, au préalable, fractionné et soigneusement dialysé. Il semble aussi que la nature de la préparation de phosphate utilisée influe sur le processus désensibilisateur. En effet, la présence de complexants de métaux lourds (magnésium titriplex) dans la préparation portée à 55° C s'oppose à la perte de sensibilité consécutive au traitement thermique (Tableau I).

TABLEAU I.

Effet du Mg titriplex sur la désensibilisation thermique de la L-thréonine désaminase de biosynthèse d'une préparation partiellement purifiée.

	m μ M de cétoacide produit par minute en présence de		p. 100 inhibition par L-isoleucine
	sans L-isoleucine	L-isoleucine 10^{-2} M	
<i>Traitement thermique en présence de :</i>			
Mg titriplex 10^{-2} M	5,55	1,20	78
Sans	2,80	1,96	30
<i>Pas de traitement thermique ...</i>	6,20	1,25	80

Mêmes conditions que pour la figure 1. Traitement thermique 10 minutes (d'après CHANGEUX [1]).

Il est donc probable que des métaux lourds sont impliqués dans ce processus. Toutefois si une préparation désensibilisée est, après traitement thermique, mise en présence de magnésium titriplex 10^{-2} M ou de β -mercapto-éthanol 10^{-3} M, la sensibilité à la L-isoleucine n'est pas récupérée. Le traitement thermique s'accompagne donc de processus irréversibles qui semblent s'ajouter aux effets dus à la fixation d'un métal.

γ) Action de divers agents chimiques.

Ces observations nous ont conduit à essayer directement le traitement de la L-thréonine désaminase de biosynthèse par divers agents chimiques, en particulier par des composés de métaux lourds. Parmi ceux essayés les mercuriels se trouvent être les plus efficaces (CHANGEUX [1]).

La figure 5 représente une cinétique de désensibilisation provoquée par l'addition de chlorure mercurique 5×10^{-6} M à une préparation

non purifiée mais dialysée de L-thréonine désaminase. Après 15 minutes de traitement à 27° C l'activité mesurée en présence de L-thréonine 2×10^{-2} M n'est plus inhibée par la L-isoleucine 10^{-3} M que de 10 p. 100. On remarque aussi que dans ces conditions la désensibilisation s'accompagne d'un accroissement significatif de l'activité dont nous discuterons plus loin l'importance.

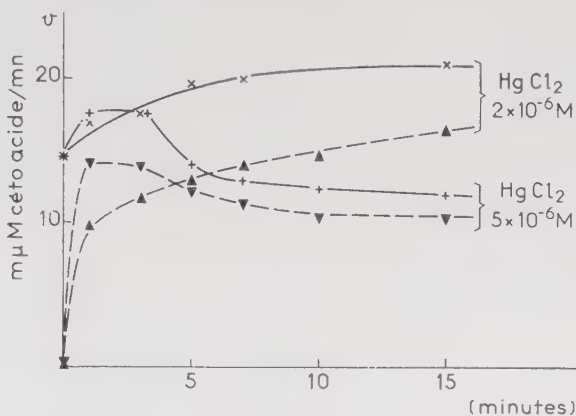


FIG. 5. — Cinétique de désensibilisation par HgCl_2 de la L-thréonine désaminase d'une préparation non purifiée.

Le chlorure mercurique est ajouté aux concentrations indiquées à une préparation de L-thréonine désaminase d'un extrait brut d'une souche déréprimée diluée à raison de 0,4 mg/ml en protéine dans du phosphate de potassium M pH 8,1. La température est maintenue à 27° C. Le dosage est effectué suivant la méthode générale après dilution d'un facteur dix en présence de L-isoleucine 10^{-3} M (courbe en traits tirés) et en l'absence d'inhibiteur (courbe en trait plein), la concentration de L-thréonine est maintenue constante (2×10^{-2} M).

Cette expérience essentielle est très aisément reproduite à condition toutefois que les concentrations de l'agent désensibilisateur soient ajustées avec soins. Les concentrations élevées de chlorure mercurique (supérieures à 10^{-5} M) entraînent une perte d'activité qui peut être considérable, les concentrations minimum efficaces sont toujours très basses (de l'ordre de 10^{-7} M en Hg^{++}) et leur valeur dépend du degré de purification de la préparation : il est vraisemblable que les protéines étrangères présentes dans l'extrait fixent ce réactif et en diminuent la concentration sous forme libre et active.

Le mode d'action précis du chlorure mercurique sur les molécules de L-thréonine désaminase n'est pas encore clair. Toutefois si l'on compare les courbes d'inhibition de l'activité désaminasique de préparations exposées au chlorure mercurique pendant des temps variés (Fig. 6), il semble que l'effet du traitement par le chlorure mercurique soit de désensibiliser totalement une fraction des molécules d'enzyme

plutôt que de diminuer progressivement l'affinité apparente de l'ensemble de la population moléculaire à l'égard de l'inhibiteur.

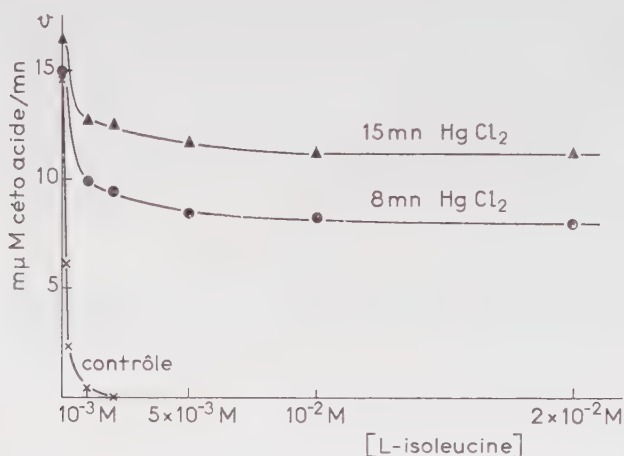


FIG. 6. — Inhibition par la *L*-isoleucine de la *L*-thréonine désaminase d'une fraction non purifiée traitée 8 mn et 15 mn par HgCl_2 $5 \times 10^{-6} \text{ M}$.
Mêmes conditions que pour la figure 5. Concentration constante de *L*-thréonine ($2 \times 10^{-2} \text{ M}$).

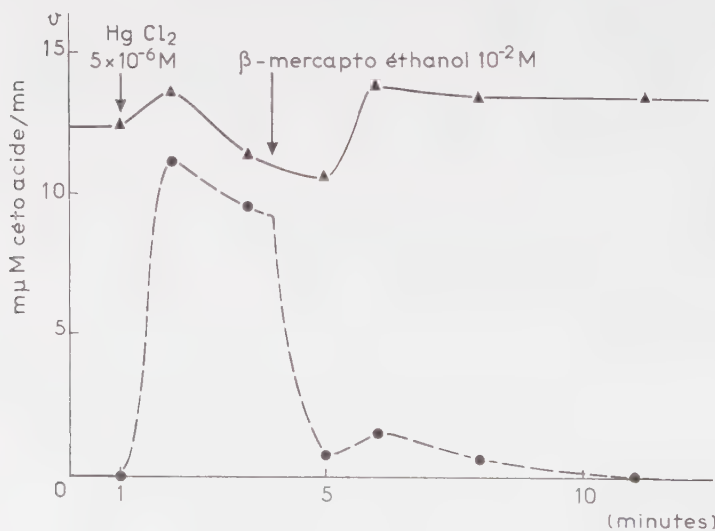


FIG. 7. — Effet du β -mercaptoéthanol sur la sensibilité à la *L*-isoleucine d'une préparation de *L*-thréonine désaminase désensibilisée par HgCl_2 .
Mêmes conditions que pour la figure 5. Essai en présence de *L*-isoleucine 10^{-3} M (courbe en traits tirés) et en l'absence d'inhibiteur (courbe en trait plein).

La sensibilité à la L-isoleucine abolie par HgCl_2 est instantanément et totalement restaurée si un excès de β -mercaptoéthanol est ajouté à la préparation (Fig. 7). Par contre si la préparation désensibilisée est mise en présence de concentrations limitées de β -mercaptoéthanol la restauration de la sensibilité bien que rapide est limitée ; il semble que des états d'équilibre s'établissent (Fig. 8).

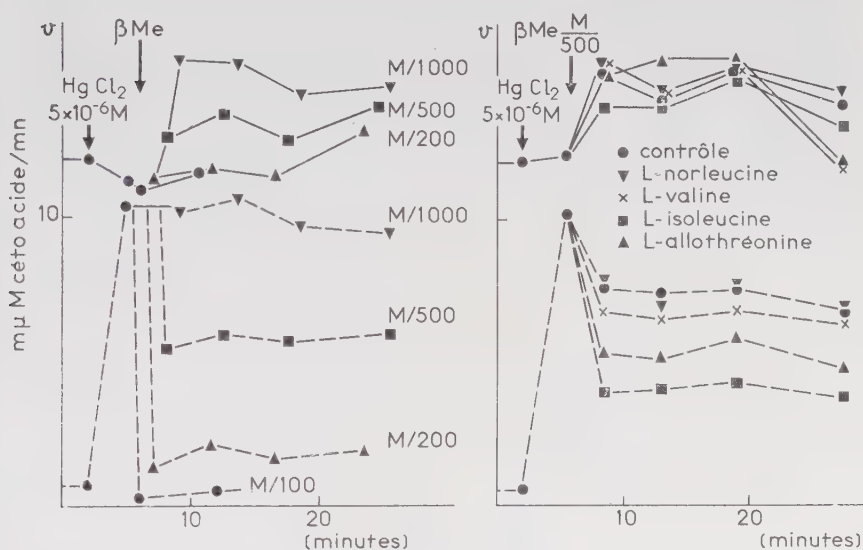


FIG. 8. — Action de concentrations variées de β -mercaptoéthanol et des effecteurs allostériques sur la restauration de la sensibilité à la L-isoleucine d'une préparation de L-thréonine désaminase de biosynthèse désensibilisée par HgCl_2 .

Mêmes conditions que pour la figure 5. Essai en présence de L-isoleucine 10^{-3} M (courbe en traits tirés) et en l'absence d'inhibiteur (courbe en trait plein). HgCl_2 et β -mercaptoéthanol sont ajoutés aux concentrations indiquées ; L-norleucine ; L-valine et L-allothréonine 10^{-3} M ; L-isoleucine 5×10^{-4} M.

δ) Action des mutations.

Les données qui viennent d'être présentées suggèrent que les propriétés régulatrices de la L-thréonine désaminase de biosynthèse dépendent directement de la structure de la molécule protéique. Il est à prévoir, si cette interprétation est exacte, que des mutations entraînant une altération de la structure primaire de l'enzyme puissent-elles aussi, provoquer une modification de ses propriétés régulatrices sans pour cela lui faire perdre son activité.

Tous les moyens de sélection employés (analogues de la L-isoleucine, de la L-thréonine, etc...) pour essayer d'isoler directement à partir d'une souche sauvage d'*E. coli* K 12 un clone muté sur les prop-

priétés régulatrices de la L-thréonine désaminase ont échoué. Par contre si, au lieu de partir d'une souche sauvage, on utilise des souches mutantes exigeantes en L-isoleucine parce que manquant de L-thréonine désaminase de biosynthèse, parmi les réserves prototrophes se trouvent des clones génétiquement modifiés chez lesquels l'activité de la L-thréonine désaminase restaurée par une seconde mutation n'est plus sensible à la L-isoleucine. Leurs principales propriétés sont consignées sur le Tableau II et sur les figures 9, 12 et 13. On constate que le type d'enzyme obtenu dépend non seulement de la mutation réverse mais aussi de la mutation d'origine qui inactive l'enzyme.

Parmi les clones réverses il s'en trouve dont la L-thréonine désaminase a les mêmes caractéristiques *cinétiques* que la souche sauvage (Fig. 9), d'autres ont perdu complètement le contrôle par rétroaction inhibitrice, d'autres ne l'ont perdu que partiellement, d'autres enfin sont plus sensibles que la souche sauvage à l'effet inhibiteur de la L-isoleucine.

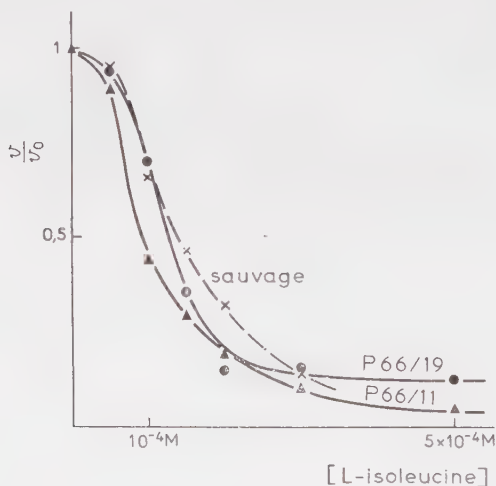


FIG. 9. — Courbe d'inhibition de la L-thréonine désaminase de biosynthèse de deux mutants réverses P 66/11 et P 66/19.

Mêmes conditions que pour le Tableau II. Les souches P 66/11 et P 66/19 sont des réverses prototrophes spontanés de la souche exigeante en isoleucine P 66 qui nous a été obligeamment transmise par Gérard Buttin.

La question se pose alors de savoir si les déterminants génétiques des propriétés régulatrices de l'enzyme sont les mêmes que les déterminants de son activité. C'est dans l'intention de répondre à cette question que les mutations inactivant la L-thréonine désaminase ainsi que plusieurs de leurs mutations réverses ont été localisées sur le chromosome bactérien. Le marqueur *isol* (exigence en L-isoleucine) situé entre les marqueurs *mannitol* et *méthionine* de la carte chromo-

somique d'*E. coli* (JACOB et WOLLMAN [4]) correspond à une mutation inactivant l'enzyme : en effet, la souche $J_{13.4}$ ayant servi de référence dans les expériences de JACOB et WOLLMAN ne possède pas d'activité L-thréonine désaminasique décelable. Cette localisation se trouve confirmée par une série de croisements que nous avons effectués entre une collection de 15 souches exigeantes en L-isoleucine, donc manquant de L-thréonine désaminase de biosynthèse, et diverses femelles polymarquées. Dans chacun de ces cas le marqueur *isol* a été reconnu étroitement lié aux marqueurs *méthionine* et *mannitol*, enfin l'ordre de ces trois marqueurs est en plein accord avec le processus qui a abouti à l'isolement d'épisomes sexuels transportant le gène *isol* (F-*isol*) à partir de deux souches Hfr transférant l'une le marqueur *méthionine* en tête puis TL, Lac etc... (Hfr 5), l'autre *mannitol* en tête puis Sm His... etc. (Hfr AB 313).

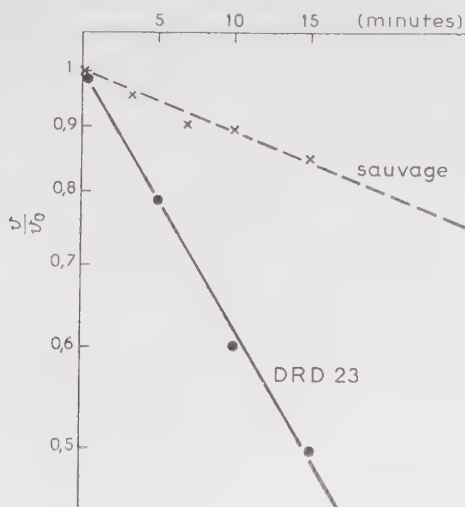


FIG. 10. — Thermosensibilité comparée de la L-thréonine désaminase de biosynthèse d'une souche mutante et de la souche sauvage de *E. coli* K 12.

L'inactivation est effectuée en présence de L-isoleucine 10^{-4} M. La souche DRD 23 provient du croisement de la souche 3/16 (dont les propriétés sont présentées sur les figures 12 et 13 avec la souche Hfr CXIR₁ déréprimée pour la L-thréonine désaminase : elle est à la fois déréprimée et désensibilisée.

Ces mutations *réverses* ont été, sauf rares exceptions, trouvées extrêmement liées au marqueur *isol* donc aux mutations d'origine. D'autre part, plusieurs souches *réverses* de ce type (la souche DRD 23 partiellement désensibilisée, par exemple) synthétisent une L-thréonine désaminase qui bien qu'active sur le substrat ne possède ni les propriétés cinétiques de l'enzyme sauvage ni surtout ses propriétés de stabilité

(Fig. 10). Une double altération de la structure primaire de la L-thréonine désaminase est en toute vraisemblance responsable de la différence de propriétés moléculaires observée entre les enzymes natifs et reverses.

Enfin, il est remarquable que la technique de sélection utilisée en portant uniquement sur l'activité de la L-thréonine désaminase de biosynthèse mène à l'isolement de souches qui, dans leur majorité, sont modifiées sur leurs propriétés régulatrices.

Des mutations du *gène de structure* (JACOB et MONOD [5, 6]) de la L-thréonine désaminase de biosynthèse peuvent donc entraîner une altération profonde de ses propriétés allostériques.

ε) *Incorporation d'analogues d'acides aminés.*

Si des mutations entraînent un changement dans les propriétés allostériques de la L-thréonine désaminase on peut espérer que l'incorporation d'analogues d'acides aminés dans la structure primaire de l'enzyme puisse provoquer de semblables perturbations.

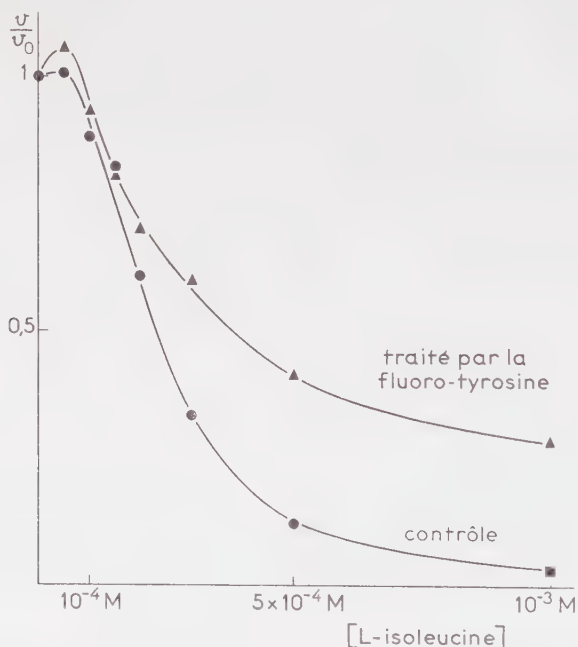


FIG. 11. — Courbe d'inhibition de la L-thréonine désaminase extraite d'une souche sauvage d'E. coli qui s'est multipliée en présence de DL-3 fluorotyrosine.

A une culture en phase exponentielle sur milieu minéral 63 glucosé est ajoutée de la DL-3 fluorotyrosine à une concentration finale 10⁻² M. La croissance est linéaire en présence de l'analogue. Après deux doublements les cellules sont centrifugées et lavées. L'extraction et le dosage sont effectués en suivant les méthodes générales.

Si l'on fait croître une souche sauvage de *E. coli* en présence de DL-3 fluorotyrosine cet analogue est incorporé à la place de la L-tyrosine dans les protéines (MUNIER et SARRAZIN [7]). Sur la figure 10 est représentée la courbe d'inhibition de l'activité désaminasique d'une préparation extraite de bactéries ayant effectué environ deux doublings dans un milieu contenant de la DL-3 fluorotyrosine 10^{-2} M. Il est clair qu'une fraction importante de l'activité n'est plus sensible à la L-isoleucine (fig. 11), elle peut en toute vraisemblance être attribuée aux molécules d'enzyme synthétisées en présence d'analogue.

ξ) Interprétations.

Tous les traitements que nous venons d'énumérer et qui aboutissent à une altération des propriétés allostériques de la L-thréonine désaminase sont connus pour modifier la structure de l'édifice protéique.

Les deux derniers cités provoquent des substitutions d'acides aminés dans la structure primaire de la molécule ; il n'a pas été dans nos possibilités d'identifier les permutations entraînées par mutation ; on sait par contre que la 3-fluorotyrosine prend la place de la L-tyrosine et l'on conçoit que les liaisons qu'établit la L-tyrosine avec d'autres acides aminés soient modifiées par la présence d'un atome de fluor en para dans son cycle benzénique.

Il est donc possible, en provoquant artificiellement des altérations de la structure protéique de la L-thréonine désaminase, d'interférer avec la transmission de l'interaction hétérotrope L-thréonine-L-isoleucine.

II. — CINÉTIQUE D'ACTION DES PRÉPARATIONS DÉSENSIBILISÉES DE L-THRÉONINE DÉSAMINASE DE BIOSYNTHESE.

Il faut toutefois remarquer que l'existence du phénomène de désensibilisation ne constitue pas à lui seul une preuve que l'interaction hétérotrope est indirecte (allostérique). Si nous nous reportons à l'interprétation proposée dans l'article III, il est possible d'envisager, en effet, que le phénomène de désensibilisation soit lié au blocage de groupes de liaison spécifiques participant directement à l'établissement du complexe enzyme-inhibiteur. Dans ces conditions, le phénomène pourrait avoir lieu aussi bien dans le cas d'une exclusion par empêchement stérique que dans le cas d'une interaction indirecte.

Mais, par contre, si l'on peut démontrer que le phénomène de désensibilisation affecte non seulement l'interaction hétérotrope mais aussi l'interaction homotrope du même coup se trouve confirmé que l'interaction hétérotrope est une interaction indirecte et que le second des deux modèles proposés au début de ce chapitre est le vrai, c'est-à-dire que la transmission des interactions homotropes et hétéotropes met en œuvre un seul et même mécanisme.

Nous nous attacherons donc dans ce paragraphe, où seront étudiées les propriétés des enzymes désensibilisés, à suivre les répercussions

de la perte de l'interaction hétérotrappe sur les interactions homotropes du substrat et de l'inhibiteur.

a) *Cinétiques d'action vis-à-vis de la L-isoleucine.*

Nous avons déjà signalé le cas particulier d'une fraction purifiée en l'absence de protecteurs spécifiques dont l'activité désaminasique est encore en partie sensible à la L-isoleucine et dont les caractéris-

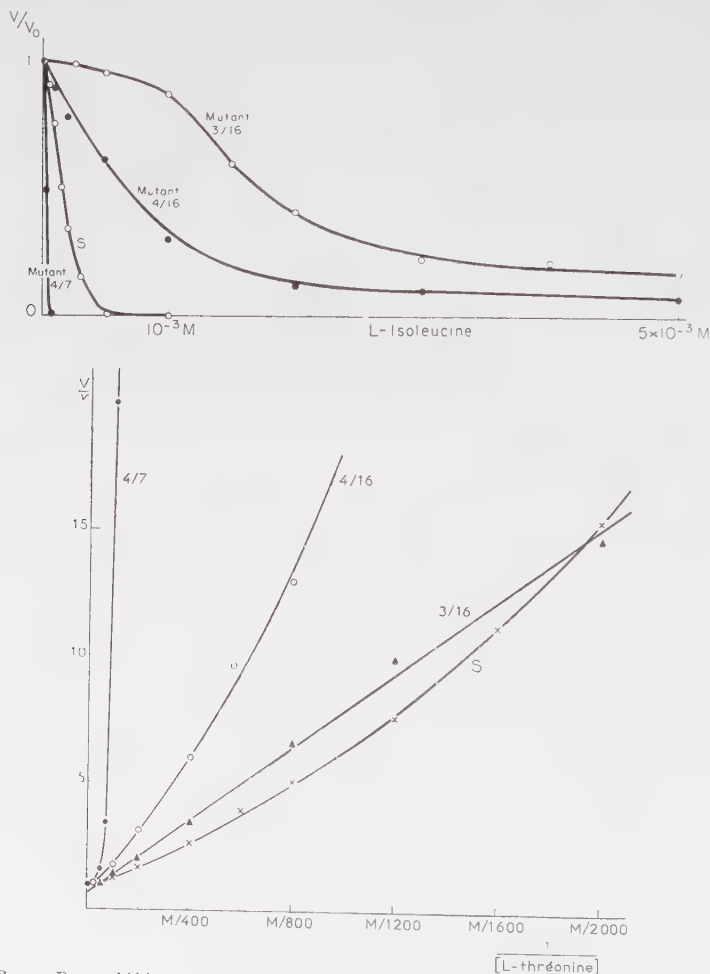


Fig. 12. — *Propriétés cinétiques de la L-thréonine désaminase de biosynthèse de plusieurs mutants structuraux.*

De même que pour les souches décrites Tableau II ces mutants ont été isolés par réversion spontanée des mutants dépourvus de L-thréonine désaminase n° 3 et n° 4. Ils ont été localisés sur le chromosome au même locus que les mutants n° 3 et n° 4 dont ils sont issus. Extraction et dosage sont effectués suivant la méthode générale.

Figure du haut : L-thréonine 2×10^{-2} M (d'après CHANGEUX 1963 [3]).

tiques de l'inhibition par la L-isoleucine sont, pour une grande part, celles d'une inhibition non compétitive.

Les fractions désensibilisées après *traitement thermique* ou après incubation en présence de *chlorure mercurique* sont plus de cent fois moins sensibles à la L-isoleucine que les préparations d'enzyme sauvage (il faut une concentration d'inhibiteur près de cent fois plus grande pour obtenir le même pourcentage d'inhibition en présence de L-thréonine 2×10^{-2} M). La constante de saturation (*) en inhibiteur qui pouvait être estimée à pH 8, dans les conditions voisines de la saturation en substrat à $1,5 \times 10^{-4}$ M passe à une valeur supérieure à 5×10^{-2} M après désensibilisation par HgCl_2 (Fig. 6). Ce résidu d'inhibition est très vraisemblablement la conséquence d'une action *directe* et non spécifique de la L-isoleucine sur le centre actif de l'enzyme.

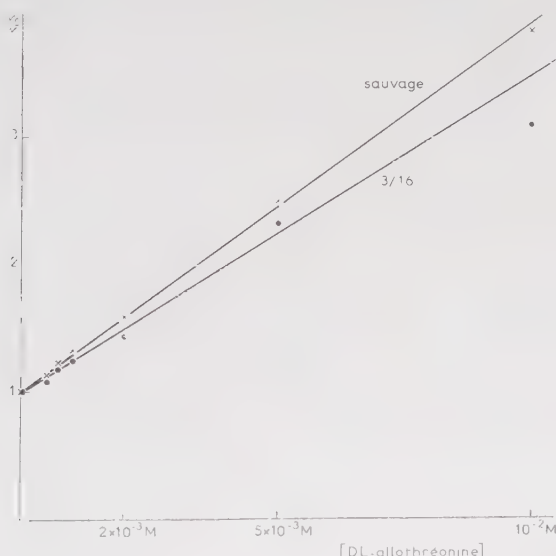


FIG. 13. — Effet de la DL-allothréonine sur l'activité de la L-thréonine désaminase de biosynthèse d'un extrait du mutant 3/16 partiellement désensibilisé à la L-isoleucine et d'un extrait du type sauvage.

Essai suivant la méthode générale. Pour l'isolement et les propriétés du mutant 3/16 voir la légende de la figure 12 (d'après CHANGEUX [3]).

Les courbes d'action obtenues à partir de souches *mutées* sur la L-thréonine désaminase sont d'une diversité considérable (Fig. 12, 13 et Tableau II) ; choisissons par exemple :

1) les mutants $30G_{c1}$, $3TG_1$, $30C_1$ (Tableau II) sont complètement désensibilisés et même, semble-t-il, activés par la L-isoleucine.

(*) Voir définition article III. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1964, 46, 1151-1173.

TABLEAU II.
Propriétés de quelques mutants sur la L-thréonine désaminase de *E. coli* K 12.

Sigele	Essai en présence de						Caractéristiques cliniques
	L-thréonine 2×10^{-2} M	L-thréonine 2×10^{-3} M	L-thréonine 2×10^{-4} M	L-thréonine 2×10^{-5} M	L-thréonine 2×10^{-6} M	L-thréonine 2×10^{-7} M	
Sauvage	100	66	63	17	155	91	71
30 G ₁ ...	100	94	133	155	151	111	365
3 T ₁ G ₁ ...	100	18	100	146	50	118	92
30 G ₂ ...	100	23	112	117	183	113	97
30 G ₃ ...	100	33	130	120	25	90	87
30 L ₂ ...	100	14	104	97	14	88	53
30 G ₄ ...	100	18	93	92	19	79	83
70 G ₁ Chl.	100	26	95	110	26	36	57
40 G ₃ Chl.	100	9	13	11	8	14	66
40 G ₄ Chl.	100	8	10	9	14	16	55
4 T ₁ G ₁ ...	100	1	10	9	26	9	57
40 G ₁ Chl	100	5	6	3	19	78	58

Ces mutants ont été isolés par réversion spontanée ou induite par l'éthyl-méthyl sulfonate (sigle avec e) de trois mutants sans L-thréonine désaminase : n° 3, n° 4 et n° 7. L'extraction de l'enzyme et l'essai d'activité ont été effectués dans les conditions standard. Le substrat et les effecteurs ont été ajoutés dans le milieu de dosage aux concentrations indiquées sur le tableau. Ces résultats préliminaires donneront lieu à une publication ultérieure.

2) La forme des courbes d'inhibition de l'enzyme extrait de la souche 3/16 (Fig. 12) est semblable à celle du type sauvage ; le coefficient n mesuré dans le système de coordonnées de Hill est voisin de 2, mais il faut environ dix fois plus de L-isoleucine pour obtenir le même pourcentage d'inhibition. La constante de saturation du substrat et de son analogue la DL-allothréonine est voisine de celle du type sauvage (Fig. 13). Tout se présente comme si l'affinité intrinsèque de l'enzyme pour la L-isoleucine avait diminué.

3) La L-thréonine désaminase des souches 4/16 et 4/17 se distingue très nettement de celle de la souche sauvage par l'absence du caractère sigmoïde de la courbe d'inhibition par la L-isoleucine : le coefficient de Hill n est mesuré voisin de 1.

Dans ce cas, les interactions homotropes entre molécules de L-isoleucine sont principalement touchées. L'une d'entre elles est moins sensible à la L-isoleucine que la souche sauvage (4/16), l'autre l'est plus (4/17).

4) Les courbes d'inhibition des souches réverses P 66/19 et P 66/11 se superposent assez bien à celle de la souche sauvage (fig. 9).

b) *Cinétiques d'action vis-à-vis de la L-thréonine.*

Dans chacune des circonstances où une préparation de L-thréonine désaminase a été complètement désensibilisée tant par le traitement thermique que par les ions mercuriques, les courbes d'action sur le substrat ont été trouvées des hyperboles en coordonnées directes, des droites dans le système de coordonnées de Lineweaver et Burk (Fig. 14 et 15). Les effets multimoléculaires du substrat ont disparu. C'est ce que l'on observe aussi (cf. Article III) lorsque le pH du milieu de dosage est élevé de 7,7 à 9 : l'affinité intrinsèque de l'enzyme pour la L-isoleucine diminue et du même coup les cinétiques d'action de l'enzyme sur le substrat en l'absence de L-isoleucine sont normalisées.

Les interactions homotropes entre récepteurs du substrat semblent donc supprimées par le même processus que celui qui conduit au découplage de l'interaction hétérotrape substrat-inhibiteur (CHANGEUX [1]).

Les données relatives aux effets de la désensibilisation sur l'affinité apparente de la L-thréonine désaminase pour la L-thréonine sont quelque peu contradictoires.

Rappelons ici que la normalisation des cinétiques d'action aux pH supérieurs à 8 s'accompagne d'un accroissement de l'affinité apparente du substrat consécutif à la suppression des interactions homotropes ; cela a aussi été signalé par FREUDLICH et UMBARGER [8] à propos d'une fraction de L-thréonine désaminase de *E. coli* traitée par NO_3Hg . Par contre, entre nos mains, la constante de saturation de l'enzyme d'*E. coli* traité par HgCl_2 ou par les températures élevées a tou-

jours été trouvée supérieure à celle de l'enzyme natif (Fig. 14) (environ deux fois plus grande).

La contradiction tient vraisemblablement au fait que les traitements auxquels l'enzyme est soumis s'accompagnent d'effets annexes sur l'activité de l'enzyme.

Par exemple, nous savons que si le traitement désensibilisateur est effectué en présence d'une concentration *trop élevée* de HgCl_2 à l'effet

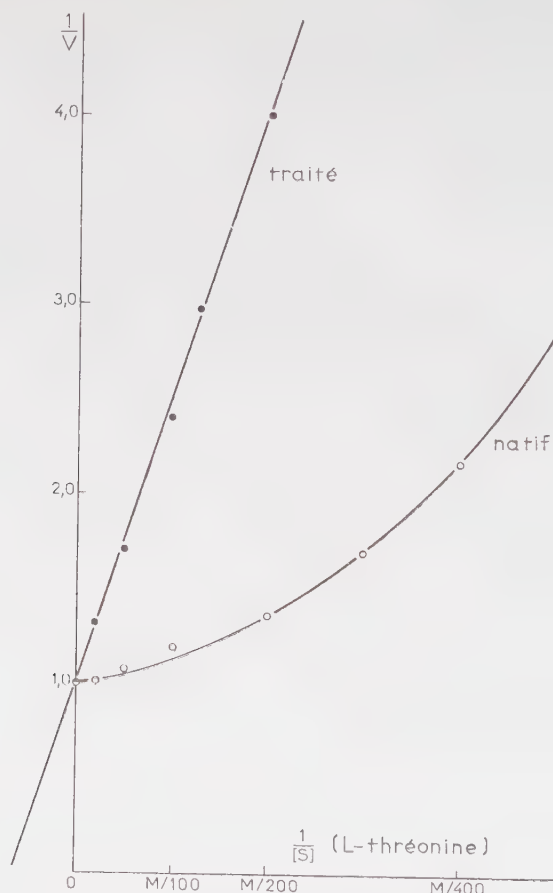


FIG. 14. — Cinétique d'action en fonction des concentrations de L-thréonine de la L-thréonine désaminase de biosynthèse d'une préparation désensibilisée par traitement thermique.

La préparation désensibilisée de L-thréonine désaminase a été obtenue suivant la méthode décrite dans la légende de la figure 4 ; temps d'incubation à 55° C : 18 minutes. L'activité de la préparation obtenue ne subit que 8 p. 100 d'inhibition par la L-isoleucine 10^{-2}M en présence de L-thréonine $2 \times 10^{-2}\text{M}$, dans les conditions générales d'essais. 27° C, pH 8,0, (D'après CHANGEUX [1]).

de désensibilisation s'ajoute un effet d'inactivation. De plus, si l'on suit au cours du temps le processus de désensibilisation par une concentration *moyenne* (2×10^{-6} M par exemple) de HgCl_2 , on se rend compte que, au contraire, la désensibilisation s'accompagne d'une *activation* de l'enzyme ; elle est particulièrement manifeste aux fortes concentrations de substrat (Fig. 5) et dans le meilleur des cas la *vitesse maximum* de l'enzyme s'accroît de 50 p. 100.

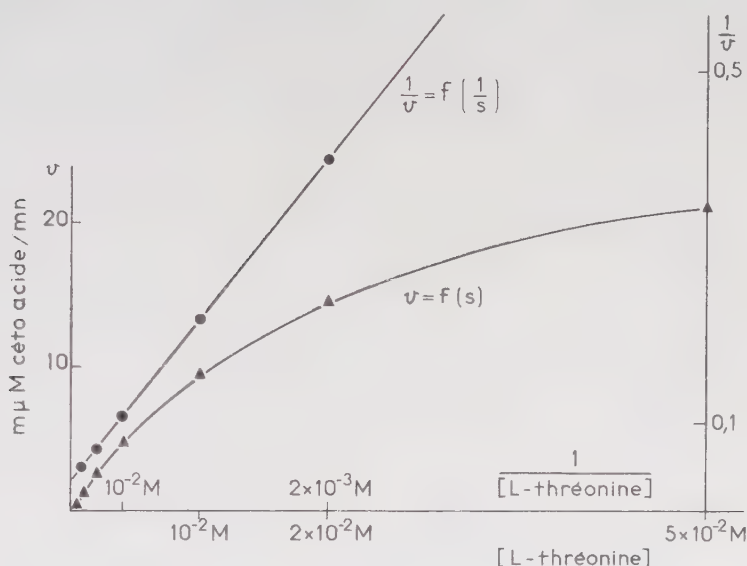


FIG. 15. — Cinétique d'action en fonction des concentrations de L-thréonine de la L-thréonine désaminase de biosynthèse d'une préparation désensibilisée par HgCl_2 .

La préparation désensibilisée a été obtenue suivant la méthode décrite dans la légende de la figure 5. Incubation en présence de HgCl_2 7×10^{-6} M pendant 10 minutes à 27°C . L'activité de la préparation obtenue subit 11 p. 100 d'inhibition par la L-isoleucine 10^{-2} M en présence de L-thréonine 2×10^{-2} M dans les conditions générales d'essais. 27°C , pH 7,70. Comparer les courbes ci-dessus avec les courbes représentées sur les figures 1 et 4, article II.

Le chlorure mercurique peut donc avoir des effets opposés sur la L-thréonine désaminase ; il est extrêmement difficile, en de telles circonstances de les contrôler séparément et, par là, de distinguer ceux qui sont conséquence directe de la suppression des interactions allostériques.

Quoi qu'il en soit, il n'en reste pas moins que, dans chacun des cas considérés, la suppression de l'interaction hétérotrope L-isoleucine-L-thréonine s'accompagne de la suppression des interactions homotropes du substrat. Voyons maintenant si cette conclusion est générale.

c) *La suppression simultanée des divers types d'interactions allostériques au cours du phénomène de désensibilisation.*

La diversité des effets provoqués par les mutations sur la molécule de L-thréonine désaminase doit permettre de vérifier si oui ou non chaque atteinte à l'interaction hétérotrope est corrélative d'une action sur l'interaction homotrope du substrat et si la réciproque est vraie.

L'enzyme extrait de la souche mutante 3/16 est principalement touchée dans son affinité pour la L-isoleucine ; *simultanément* les interactions homotropes entre molécules de substrat sont perdues (Fig. 12).

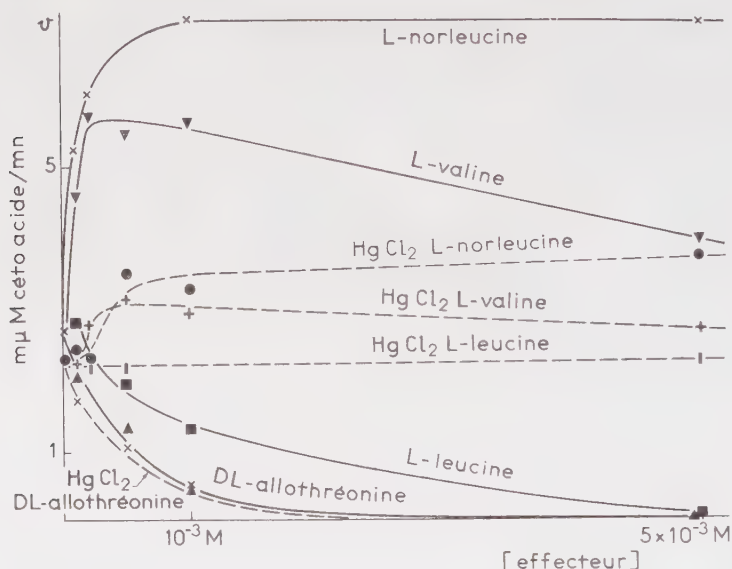


FIG. 16. — Comparaison de l'action de divers ligands, en particulier des activateurs allostériques, sur l'activité d'une préparation de L-thréonine désaminase native et désensibilisée par HgCl_2 .

Les préparations utilisées sont les mêmes que celles qui ont servi à établir les courbes de la figure 15. Essais suivant la méthode générale, à 27°C , pH 7,70, L-thréonine $2 \times 10^{-3} \text{ M}$.

En trait plein : préparation d'enzyme natif, en traits tirés : préparation d'enzyme traité par HgCl_2 .

Les souches 4/16 et 4/17 synthétisent des enzymes dont les interactions homotropes entre molécules de L-isoleucine semblent avoir disparu ; de plus elles sont simultanément affectées dans leurs cinétiques d'action sur le substrat : la constante de saturation en L-thréonine est dans chaque cas très supérieure à celle de l'enzyme sauvage et les interactions homotropes semblent, elles-aussi, modifiées.

Enfin, jamais nous n'avons trouvé d'enzyme qui soit modifié sur les interactions homotropes du substrat sans l'être sur les hétéotropes.

Il semble donc de règle, du moins dans les conditions expérimentales utilisées, que l'on ne peut interférer avec l'interaction hétérotrope sans entraîner une profonde modification des propriétés des récepteurs du substrat et en particulier de leurs interactions homotropes ; la réciproque semble exacte.

Cette conclusion peut même être étendue à tous les types d'interactions *allostériques* en particulier à l'activation par la L-norleucine et par la L-valine. La figure 16 illustre ce fait. La désensibilisation par HgCl_2 supprime l'effet d'activation par la L-valine et la L-norleucine. L'effet mixte de la L-leucine disparaît lui aussi. Seul l'effet d'inhibition par la DL-allothréonine, interaction directe, persiste. En une seule étape, tous les types reconnus d'interactions allostériques ont été découplés.

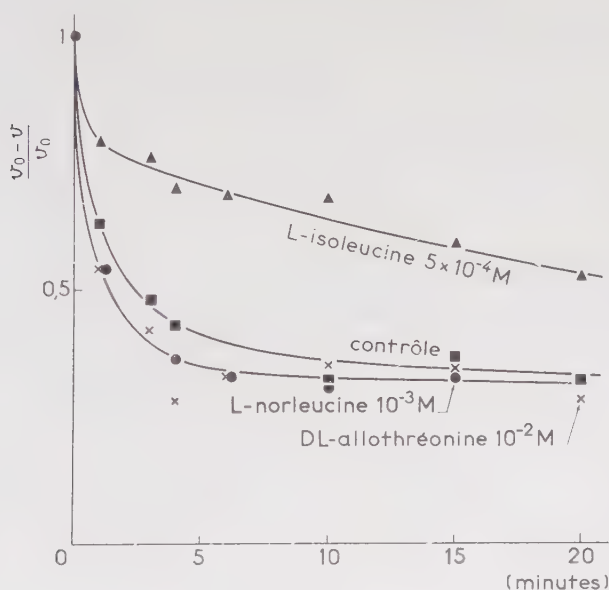


FIG. 17. — Effet de divers ligands sur la cinétique de désensibilisation de la L-thréonine désaminase de biosynthèse par HgCl_2 .

La désensibilisation est suivie dans les mêmes conditions que celles décrites dans la légende de la figure 5 en présence ou en l'absence des effecteurs aux concentrations indiquées. En ordonnée est portée la fraction de l'activité désaminasique sensible à l'inhibition par la L-isoleucine 10^{-3} M en présence de L-thréonine 10^{-2} M .

Malgré ce résultat nous avons tenté de séparer chacun des effets de la désensibilisation en essayant divers composés, effecteurs allostériques ou analogues du substrat, sur la désensibilisation par les ions mercuriques. Il est clair sur les figures 17 et 18 que la L-isoleucine protège à la fois contre la perte de sensibilité à la L-isoleucine, et con-

tre l'accroissement d'activité observé aux fortes concentrations de substrat, activation que nous savons pouvoir être mise en relation avec la suppression des interactions homotropes de la L-thréonine. Il n'est donc pas possible de s'opposer par ce moyen au découplage simultané des divers types d'interactions allostériques.

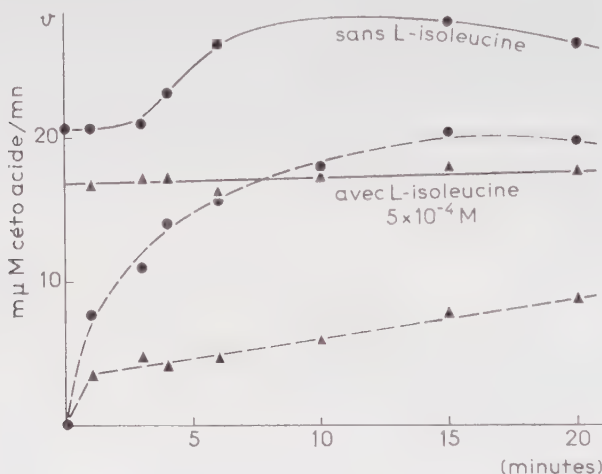


FIG. 18. — Effet de la L-isoleucine sur la cinétique de désensibilisation de la L-thréonine désaminase de biosynthèse par HgCl_2 .

Mêmes conditions que pour la figure 17. Courbes en traits tirés essais en présence de L-isoleucine 10^{-3} M ; courbes en trait, plein pas d'inhibiteur. Essai suivant la méthode générale.

Le phénomène de désensibilisation affecte donc en toute circonstance et simultanément les divers types d'interactions allostériques. Celles-ci mettent en jeu un mécanisme *unique* et indécomposable et constituent une propriété intégrale de la molécule.

III. — CONCLUSIONS.

Diverses méthodes, menant chacune à une altération de la structure de la molécule de L-thréonine désaminase, rendent possible la perte de la sensibilité à la L-isoleucine tout en conservant l'activité désaminasique (phénomène de *désensibilisation*). De cette observation ainsi que de la perte *simultanée* des interactions homo- et hétérotropes au cours du processus de désensibilisation, il découle que la transmission des interactions allostériques s'effectue par l'intermédiaire de la molécule protéique suivant un mécanisme unique qui dépend de la *construction générale de l'enzyme*.

Il est remarquable de constater que les principaux résultats et interprétations décrites dans ce chapitre à propos de la L-thréonine-désa-

minase de biosynthèse sont généralisables à la plupart des enzymes de contrôle.

1) Dans tous les cas où le phénomène de désensibilisation a été reproduit, des techniques de désensibilisation très semblables à celles que nous avons décrites à propos de la L-thréonine désaminase ont été appliquées :

Mercuriels (ATCase (GERHART et PARDEE, [9] [10] [11], ATP-PRPP-pyrophosphorylase (MARTIN [12]), désoxycytidylate aminohydrolase (SCARANO *et al.* [13])).

Températures élevées (ATCase (GERHART et PARDEE, [9]), homosérine-déshydrogénase (PATTE *et al.*, [14], COHEN *et al.* [15])).

Mutations (acétolactate-synthétase (LEAVITT et UMBARGER, [16], ATP-PRPP-pyrophosphorylase (SHEPPARD et HARTMAN, [17] ; AMES et HARTMANN [18], premier enzyme de la synthèse du tryptophane (MOYED [19]), homosérine déshydrogénase (COHEN *et al.*, [15])).

2) Le découplage simultané des interactions homotropes et hétérotropes (CHANGEUX 1961 [1]) a pu aussi être observé dans chacun des cas où a été menée à bien la désensibilisation d'un système faisant l'objet d'effets compétitifs de la part du métabolite régulateur (système K) : ATCase (GERHART et PARDEE [9] [10] [11]) désoxycytidylate aminohydrolase (SCARANO *et al.* [13]).

Dans le cas des enzymes inhibés non compétitivement par l'effecteur de contrôle (système Vmax) la désensibilisation lorsqu'elle est possible n'affecte pas les propriétés d'affinité du centre actif de l'enzyme : homosérine déshydrogénase (PATTE *et al.* [44]), ATP-PRPP pyrophosphorylase (MARTIN [12]). Il n'y a pas lieu de s'en étonner puisque nous le savons, les interactions homotropes du substrat ne sont pas décelées dans ces systèmes.

Ces derniers résultats ne s'opposent donc d'aucune façon à l'interprétation suivant laquelle les interactions hétérotropes et les interactions homotropes, lorsqu'elles existent, relèvent d'un seul et même mécanisme qui met en jeu une organisation intégrale de la molécule d'enzyme. Nous verrons, au cours du prochain chapitre que la structure quaternaire de la molécule intervient tout particulièrement dans cette organisation.

RÉSUMÉ.

1. Des préparations de L-thréonine désaminase qui ne sont plus sensibles à l'inhibition par la L-isoleucine, effecteur régulateur, mais encore actives sur la L-thréonine sont obtenues par divers procédés : chauffage à 55° C, traitement par les composés mercuriques, isolement de souches de *E. coli* K 12 mutées dans le gène de structure de la

L-thréonine désaminase et (ou) par l'incorporation *in vivo* de la 3-fluorotyrosine.

2. Les traitements qui suppriment les interactions hétéotropes suppriment simultanément les interactions homotropes, la courbe de saturation du substrat est convertie en hyperbole.

Il en résulte que les interactions allostériques se font par l'intermédiaire de la molécule protéique et dépendent de son architecture générale.

SUMMARY.

1. Preparations of L-threonine deaminase no longer sensitive to inhibition by L-isoleucine but still active on L-threonine are obtained by various procedures : heating at 55°C, treatment by mercuric compounds, isolation of strains of *E. coli K 12* mutant in the structure of L-threonine deaminase and/or *in vivo* incorporation of 3-fluorotyrosine.

2. Treatments which suppress heterotropic interactions simultaneously suppress homotropic interactions ; the substrate saturation curve is converted from a sigmoid to an hyperbola.

It is concluded that allosteric interactions are mediated by the protein molecule and are dependent on its general architecture.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. L-Threonin-Deaminase-Präparationen, welche gegenüber der Inhibition durch L-Isoleucin nicht mehr empfindlich, aber trotzdem noch auf das L-Threonin wirksam sind, werden durch verschiedene Verfahren erhalten : Erwärmen auf 55° C, Behandlung durch Quecksilberverbindungen, Isolierung der Stämme des Mutanten von *E. coli K12* für die Struktur der L-Threonin-Deaminase und (oder) Einbau von 3-Fluortyrosin *in vivo*.

2. Die Behandlungen, welche die heterotropen Interaktionen beseitigen, beseitigen gleichzeitig die homotropen Interaktionen, die Sättigungskurve des Substrats ändert sich von einer Sigmoidkurve zu einer Hyperbel.

Man schliesst daraus, dass die allosterischen Interaktionen durch die Vermittlung des Proteinmoleküls erfolgen und von seiner allgemeinen Architektur abhängen.

BIBLIOGRAPHIE.

1. CHANGEUX, J. P. — Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 1961, 26, 313.
2. CHANGEUX, J. P. — *J. Mol. Biol.*, 1962, 4, 220.
3. CHANGEUX, J. P. — Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 1963, 28, 497.
4. JACOB, F. et WOLLMAN, E. — 1961, « Sexuality and the genetics of bacteria », Academic Press, New York and London.
5. JACOB, F. et MONOD, J. — *C. R. Acad. Sci.*, 1959, 249, 1282.
6. JACOB, F. et MONOD, J. — *J. Mol. Biol.*, 1961, 3, 318.
7. MUNIER, R. et SARRAZIN, G. — *C. R. Acad. Sci.*, 1963, 256, 3376.
8. FREUNDLICH, M. et UMBARGER, H. E. — Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 1963, 28, 505.
9. GERHART, J. C. et PARDEE, A. B. — *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 891.
10. GERHART, J. C. et PARDEE, A. B. — Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 1963, 28, 491.
11. GERHART, J. C. et PARDEE, A. B. — *Fed. Proc. Symp.*, 1964, 23, 727.

12. MARTIN, R. G. — *J. Biol. Chem.*, 1962, **237**, 257.
 13. SCARANO, E., GERACI, G., POLZELLA, A. et CAMPANILE, E. — *J. Biol. Chem.*, 1963, **238**, PC 1556.
 14. PATTE, J. C., LE BRAS, G., LOVINY, T. et COHEN, G. N. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1963, **67**, 16.
 15. COHEN, G. R., PATTE, J. C., TRUFFA-BACHI, P., SAWAS, C. et DOUDOROFF, M. — Colloque International C.N.R.S. « Mécanismes de régulation des activités cellulaires chez les microorganismes », Marseille, 1963, (sous presse).
 16. LEAVITT, R. I. et UMBARGER, H. E. — *J. Biol. Chem.*, 1961, **236**, 2486.
 17. SHEPPARD, D. E. et HARTMAN, P. E. — *Fed. Proc.*, 1963, **22**, 475.
 18. AMES, B. N. et HARTMAN, P. E. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1963, **28**, 349.
 19. MOYED, H. S. — *J. Biol. Chem.*, 1960, **235**, 1098.
-



Imprimerie M. DECLUME, Lons-le-Saunier.

SUR LES PROPRIÉTÉS ALLOSTÉRIQUES DE LA L-THRÉONINE DÉSAMINASE DE BIOSYNTHÈSE. V. — LA TRANSITION ALLOSTÉRIQUE.

par Jean-Pierre CHANGEUX.

Institut Pasteur, Service de Biochimie cellulaire.

(Mémoire reçu le 10 juin 1964).

L'analyse du phénomène de désensibilisation et de ses conséquences (*) nous a amené à conclure qu'un seul mécanisme peut être rendu responsable de l'existence et de la transmission simultanée des interactions allostériques homo- et hétérotropes. Nous avons souligné que ce mécanisme met en jeu une construction générale de la molécule d'enzyme sans toutefois en préciser la nature. Sommes-nous maintenant en mesure de l'identifier ?

On doit à J. WYMAN [1] d'avoir discuté en détail, au sujet de l'hémoglobine, la relation causale qui existe entre la présence d'une structure *quaternaire* (existence de sous-unités) de la molécule protéique et la transmission des interactions d'affinité entre hèmes que nous savons être assimilables à des interactions allostériques homotropes. Etant exclu que cette transmission puisse s'effectuer sans qu'intervienne une modification de structure réversible de l'édifice polypeptidique (invoquant par exemple des propriétés semi-conductrices de la molécule), il était logique de penser, et cela a été bien établi depuis (MUIRHEAD et PERUTZ [2], que la fixation d'oxygène s'accompagne d'une modification conformationnelle de la molécule et, plus précisément, d'un changement spécifique de sa structure quaternaire (BENESCH et BENESCH [3], BENESCH et al. [4], BRIEHL [5]).

Tenant compte du fait, mis en évidence par l'analyse de la désensibilisation de la L-thréonine désaminase de biosynthèse, que les mêmes transitions sont mises en jeu par la transmission des interactions homotropes et des interactions hétérotropes, il est légitime de faire l'hypothèse que le mécanisme reconnu pour les interactions d'affinités homotropes de l'hémoglobine et de l'oxygène est transportable à l'ensemble des interactions allostériques de la L-thréonine désaminase de biosynthèse.

(*) Sur les propriétés allostériques de la L-thréonine désaminase de biosynthèse, IV. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1965, 47, 115.

Au cours de ce chapitre, nous chercherons à vérifier qu'aux divers états d'activité de la molécule de la L-thréonine désaminase correspondent des états d'association différents entre sous-unités et nous identifierons par là les *transitions allostériques* accompagnant la fixation des effecteurs et du substrat à des modifications spécifiques de la structure quaternaire de la molécule.

I. — *La transition allostérique est-elle une transition d'agrégation ?*

L'hypothèse la plus simple qui mette en relation directe la structure quaternaire d'une molécule d'enzyme avec son état d'activité est évidemment celle qui fait correspondre aux états d'activité de la molécule des états d'agrégation différents. La transition allostérique s'identifierait à une transition d'agrégation.

On doit à FRIEDEN puis à TOMKINS et à ses collaborateurs d'avoir formulé cette hypothèse à propos de la glutamate déshydrogénase du foie de bœuf, enzyme dont l'activité est modifiée par diverses petites molécules DPN, TPN, ATP, stéroïdes, acides aminés, etc... Par les méthodes d'ultracentrifugation analytique on peut montrer en effet que les activateurs de l'enzyme favorisent la présence d'une forme agrégée sédimentant rapidement ($M = 10^6$) alors que les inhibiteurs au contraire, provoquent l'apparition d'une forme moléculaire de l'enzyme sédimentant beaucoup plus lentement ($M = 250.000$) (FRIEDEN [6], YIELDING et TOMKINS [7], TOMKINS et YIELDING [8]).

Plusieurs exemples d'enzymes de mammifères pourraient être cités à côté de celui-là (références dans MONOD, CHANGEUX, JACOB [9]) à propos desquels, comme pour la glutamate déshydrogénase de bœuf, il semblait logique d'assigner à une forme agrégée de la molécule un état d'activité différent d'une forme dissociée de celle-ci.

Bien que, le plus souvent, la signification de la régulation par les ligands mis en jeu ne soit pas claire, une transposition du modèle proposé par FRIEDEN et TOMKINS aux enzymes de régulation bactériens était raisonnable.

*
**

S'il existe une correspondance entre divers états d'agrégation de la molécule de L-thréonine désaminase de biosynthèse et divers états d'activité de l'enzyme, il y a lieu de prévoir : d'une part un effet de la concentration d'enzyme sur les propriétés cinétiques et plus particulièrement sur la sensibilité de l'activité désaminasique aux effecteurs, d'autre part une action de ces effecteurs sur le coefficient de sédimentation de la protéine support de l'activité.

Aucune de ces prédictions ne s'est trouvée vérifiée par l'expérience :

1) Il n'existe aucun effet de la dilution de l'enzyme sur la sensibilité de la L-thréonine désaminase à la L-isoleucine (Fig. 1).

2) Les centrifugations menées en présence d'effecteurs allostériques dans des gradients de saccharose (Fig. 2) ou dans des cellules à cloison fixe (Tableau I) n'ont *jamais* permis de déceler un changement significatif du coefficient de sédimentation de la L-thréonine désaminase (CHANGEUX [11]).

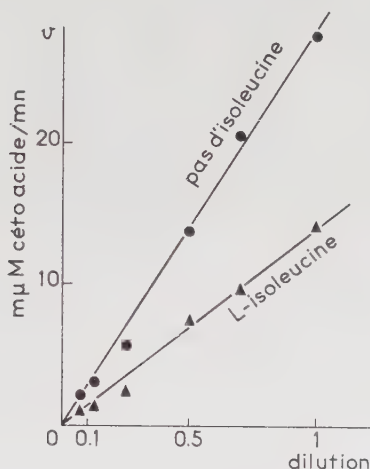


FIG. 1. — Courbe de dilution de la L-thréonine désaminase de biosynthèse. Pour chaque concentration d'enzyme l'activité est essayée en présence et en l'absence de L-isoleucine $1,5 \times 10^{-4}$ M.

Essais suivant la méthode générale en présence de L-thréonine 2×10^{-2} M à pH 8,0. La dilution 1 correspond à une concentration de 60 μ g en protéine par millilitre d'un extrait brut dialysé d'une souche dérprimée.

TABLEAU I.

Sédimentation de la L-thréonine désaminase de biosynthèse dans une cellule à cloison fixe.

Expérience n° 1		Expérience n° 2	
Contrôle	L-isoleucine 5×10^{-4} M	Contrôle	L-isoleucine 10^{-3} M
3,6	3,6	3,7	3,9

La centrifugation est effectuée dans une centrifugeuse Spinco modèle E avec une cellule à cloison fixe (fixed partition cell) en présence de phosphate de potassium 2×10^{-1} M, pH 8,2 ; de citrate de sodium 10^{-1} M, pH 8,2 ; 1,5 mg en protéine d'un extrait brut dialysé d'une souche dérprimée ; volume total 0,5 ml. Température : 3° C. Durée de la centrifugation : 45 minutes. Calcul des coefficients de sédimentation absolus, *non corrigés pour la température*. Cette expérience a été réalisée en collaboration avec A. FRISCH (d'après CHANGEUX [11]).

L'évènement primaire corrélatif de l'établissement de complexes de la molécule de L-thréonine désaminase avec les effecteurs allostériques n'est donc pas une transition d'agrégation.

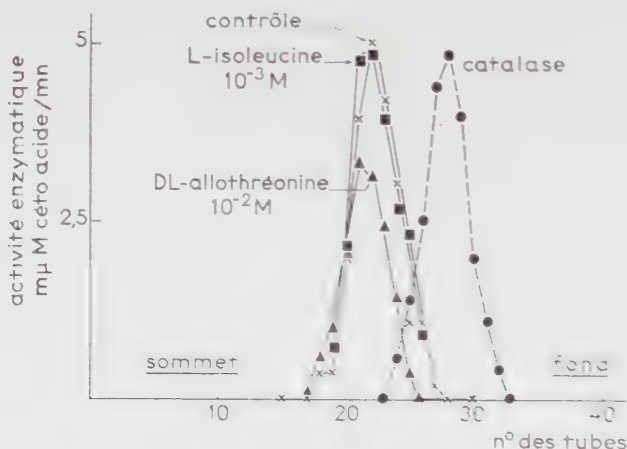


FIG. 2. — Sédimentation de la L-thréonine désaminase de biosynthèse dans un gradient de saccharose en présence de divers ligands.

Le gradient linéaire de saccharose est établi en présence de phosphate de potassium 5×10^{-1} M, pH 8.1, magnésium titriplex 10^{-3} M, glycine 10^{-2} M et d'effecteur à la concentration indiquée. Volume total 4.5 ml : concentration de saccharose maximum 20 g/100 ml, minimum 5 g/100 ml. 0.2 ml d'un extrait brut d'une souche déréprimée (3 mg de protéine) sont mélangés avec 120 μg de catalase cristallisée et déposés délicatement à la surface libre du gradient. Centrifugation dans la Spino modèle V, rotor à éléments mobiles SW 39, pendant 10 heures à 39.000 tours par minute. Température 3°C. Le fond des tubes centrifugés est percé et leur contenu collecté goutte par goutte. Catalase et L-thréonine désaminase sont essayés sur chaque fraction. Le coefficient de sédimentation de la L-thréonine désaminase est calculé suivant la méthode de MARTIN et AMES [10] en prenant pour la catalase $s_{20} = 11.0$; il a été trouvé voisin de 8.6.

La réversibilité très rapide (moins de 30 secondes) de l'inhibition de l'enzyme par la L-isoleucine (Fig. 3) est en parfait accord avec cette conclusion.

Cette conclusion a même été généralisée aux enzymes qui, au départ, avaient servi de modèle. En effet FRIEDEN lui-même [12] et ULLMANN et al. [24] montraient par la suite respectivement sur la glutamate déshydrogénase et sur la phosphorylase b que les effets d'agrégation provoqués par la présence de ligand, décelés aux fortes concentrations de protéine, disparaissent aux faibles concentrations de protéine autorisées par la méthode de centrifugation en gradient de saccharose ou en cellule à cloison fixe. L'effet sur l'état d'agrégation de ces

enzymes est donc un phénomène secondaire qui traduit, en l'amplifiant, un changement conformationnel au départ beaucoup plus fin (*).

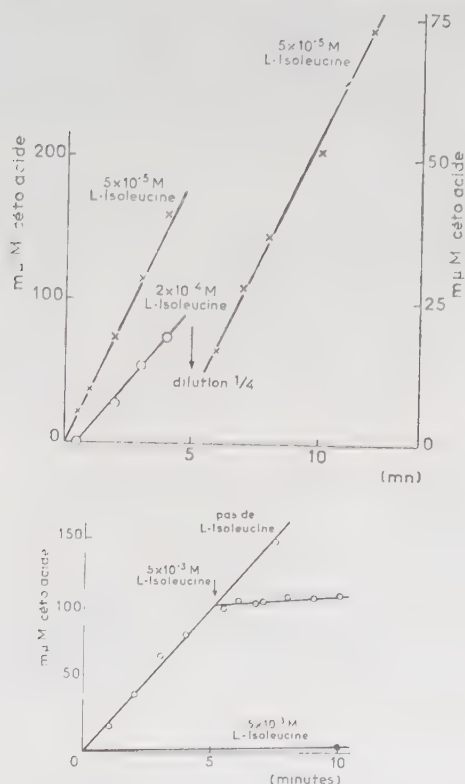


FIG. 3. — Réversibilité de l'inhibition de la L-thréonine désaminase de biosynthèse par la L-isoleucine.

Graphique du bas : addition de L-isoleucine au temps marqué d'une flèche.

Graphique du haut : la concentration en L-isoleucine est brutalement abaissée de $2 \times 10^{-4} M$ à $5 \times 10^{-5} M$ par dilution du milieu d'incubation d'un facteur 4 au temps marqué d'une flèche. La concentration de L-thréonine reste constante. L'échelle de gauche est valable pour les mesures avant dilution, celle de droite pour les mesures après dilution.

Essais suivant la méthode générale, en présence de L-thréonine $2 \times 10^{-2} M$.

II. — Action de l'urée sur l'activité de la L-thréonine désaminase de biosynthèse.

Puisque les transitions allostériques de la L-thréonine désaminase ne sont pas des transitions d'agrégation doit-on pour autant abandon-

(*) Il n'est d'ailleurs pas exclu que la forme de la glutamate déshydrogénase de poids moléculaire 10^6 ait des propriétés d'activité légèrement différentes de la forme active moins agrégée ($M = 250.000$) : c'est ce que montrent les travaux récents de l'équipe de G. TOMKINS relatifs à la variation de l'activité alanine déshydrogénase de la glutamate déshydrogénase de bœuf en fonction de son état d'agrégation (TALAL et al. [13], TOMKINS et al. [14]).

ner l'hypothèse qu'elles s'identifient à des modifications de la structure quaternaire de la molécule ? La double évidence de la finesse des remaniements structuraux à déceler, s'ils existent, et de l'impossibilité d'utiliser pour ce faire la plupart des méthodes physiques courantes (l'extrême instabilité de l'enzyme, l'impureté des préparations s'y opposent) nous a conduit à chercher des *preuves indirectes*. Les meilleures nous sont fournies par l'action de l'urée sur l'activité de la L-thréonine désaminase en l'absence et en présence des effecteurs de contrôle (CHANGEUX [11]).

En présence d'urée 1,5 M et de divers sels agissant comme protecteurs (cf. légende Fig. 4), la cinétique d'inactivation d'une préparation purifiée de la L-thréonine désaminase ne suit pas une loi logarithmique simple : pendant les premières minutes la chute d'activité est rapide puis se stabilise et devient négligeable pour une expérience de courte durée (Fig. 4 et suivantes).

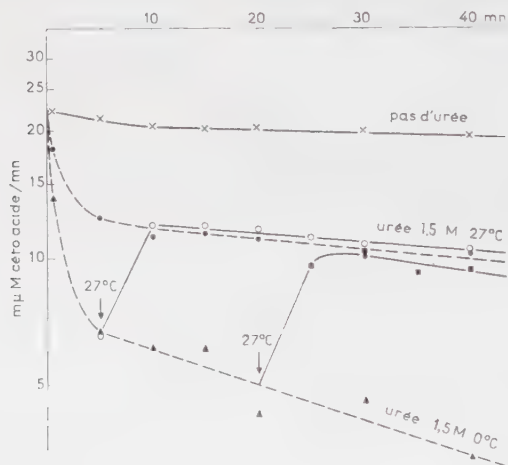


FIG. 4. — *Inactivation réversible de la L-thréonine désaminase de biosynthèse en présence d'urée 1,5 M.*

La L-thréonine désaminase d'une préparation purifiée 10 fois est équilibrée pour les temps et températures indiquées dans les conditions suivantes : urée 1,5 M ; citrate de sodium 10^{-1} M pH 8,2 ; phosphate de potassium 4×10^{-1} M pH 8,2 ; Mg titriplex 10^{-2} M ; 360 μ g de protéine par ml. Après quoi l'activité enzymatique est mesurée après dilution 10 fois dans le milieu général d'essais équilibré à 27°C. Les flèches indiquent le changement rapide de température de 0° à 27°C.

(D'après CHANGEUX [11]).

Une courbe de cette forme pourrait être obtenue s'il y avait réactivation de l'enzyme au cours de l'essai d'activité. Nous avons soigneusement éliminé cette éventualité. Pour effectuer la mesure d'activité le mélange en cours d'inactivation est dilué dix fois dans le milieu

de dosage qui contient le substrat, dans ces conditions, il y a à la fois : dilution de l'urée à une concentration où elle n'a plus d'effet sur l'enzyme, et dilution de l'enzyme ; on peut alors constater que la production d'acide cétonique pendant la mesure est parfaitement linéaire en fonction du temps (Fig. 5). Il n'y a donc *pas* réactivation de l'enzyme pendant l'essai et chaque point de la courbe d'inactivation représente bien l'état d'activité de l'enzyme en présence d'urée.

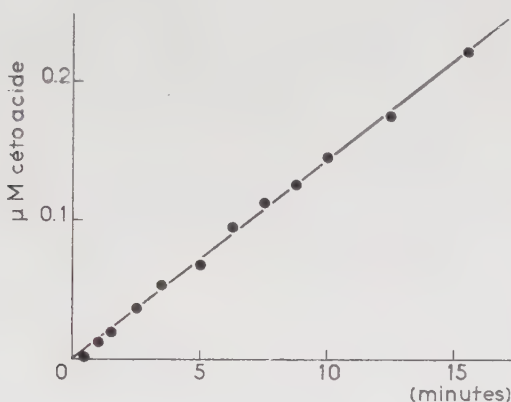


FIG. 5. — Essai de l'activité de la L-thréonine désaminase de biosynthèse après traitement par l'urée 1,5 M.

La L-thréonine désaminase d'une fraction purifiée 10 fois est incubée en présence d'urée 1,5 M suivant la méthode décrite dans la légende de la figure 4, à 27°C pendant 7 minutes puis le mélange est dilué 10 fois dans le milieu général d'essai équilibré à 27°C.

Ceci étant, une forme de courbe de ce genre pourrait aussi s'observer si la population de molécules d'enzyme était hétérogène : les molécules différant entre elles par leur susceptibilité à l'inactivation par l'urée. Dans ces conditions, on ne s'attendrait pas à ce que la fraction d'enzyme inactivée au plateau dépende de la concentration d'urée (Fig. 6).

L'interprétation la plus vraisemblable de la forme de cette courbe est qu'en présence d'urée la réaction d'inactivation est *limitée par la réaction réverse* et qu'un *équilibre* s'établit entre une forme active et une forme inactive de l'enzyme. Cette interprétation est confirmée par les faits suivants :

L'abaissement de la température d'inactivation stimule l'effet de l'urée et à 0°C la fraction d'enzyme inactive au plateau est beaucoup plus élevée qu'à 27°C (Fig. 4). Dans ces conditions, le transfert de 0°C à 27°C d'une préparation inactivée à 0°C est suivi d'une *réactivation* de l'enzyme jusqu'à la valeur du plateau de la courbe d'inactivation à 27°C. C'est là une *preuve* de l'existence, en présence d'urée,

d'un équilibre *réversible* entre deux états : l'un actif, l'autre inactif de l'enzyme.

De plus, il est possible de démontrer que les deux états d'activité de l'enzyme, en présence d'urée, correspondent à deux états *d'agrégation* différents de la molécule. En effet, les caractéristiques de l'équi-

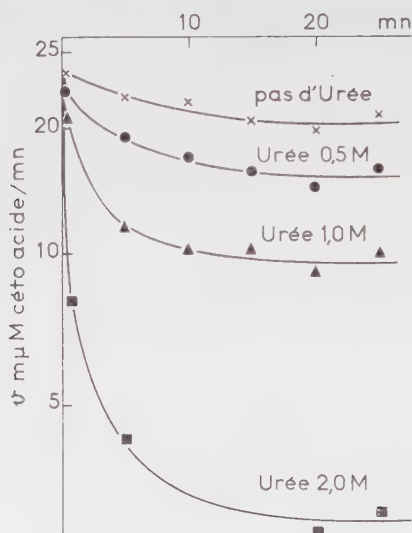


FIG. 6. — Effet des concentrations d'urée sur la cinétique d'inactivation de la L-thréonine désaminase de biosynthèse.

Mêmes conditions que celles décrites dans la légende de la figure 4 sauf pour les concentrations en urée. Température maintenue constante : 27°C.

libre ainsi établi dépendent de la *concentration d'enzyme* présent : si l'on porte, en fonction des concentrations de protéine, les vitesses initiales de renaturation lors du transfert de 0°C à 27°C ou bien encore les fractions d'enzyme inactivé à l'équilibre, les courbes que l'on obtient ne sont pas des droites (Fig. 7). L'ordre de la réaction d'inactivation en fonction des concentrations de protéine est donc d'ordre supérieur à l'unité ; il peut être estimé voisin de deux. L'urée provoque donc selon toute apparence une *dépolymérisation réversible* de la L-thréonine désaminase en *au moins deux* de ses sous-unités constitutives enzymatiquement *inactives*.



C'est là une démonstration indirecte mais semble-t-il valable de l'état polymérique de la L-thréonine désaminase de biosynthèse, Diverses

observations précédemment citées, le suggéraient déjà fortement. En particulier s'inspirant des considérations théoriques formulées par WYMAN [1], il est légitime de tenter une évaluation du nombre q de récepteurs de la L-thréonine à partir du coefficient n obtenu après tracé des courbes d'action du substrat dans le système de coordonnées de Hill. Si l'on suppose en effet que les interactions entre récepteurs

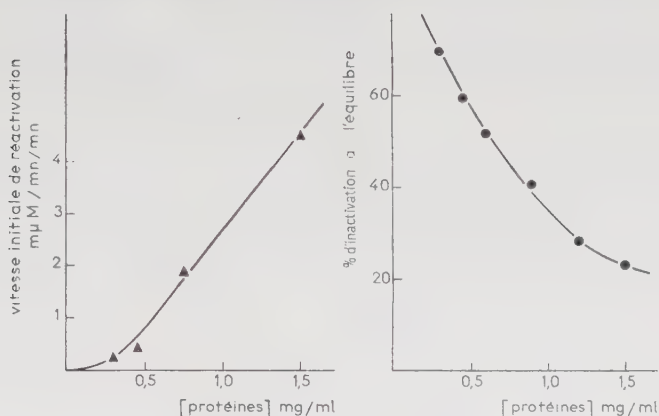


FIG. 7. — *Effet des concentrations d'enzyme sur les caractéristiques de l'équilibre d'inactivation provoqué par l'urée 1,5 M.*
 Graphique de gauche : effet sur la vitesse de réactivation suivant le transfert de 0°C à 27°C .

Graphique de droite : effet sur la fraction de l'activité désaminasique inactivée à l'équilibre en présence d'urée 1,5 M. Température constante 27°C .

Conditions décrites dans la légende de la figure 4.

(D'après CHANGEUX [11]).

sont purement des interactions d'affinité, la valeur maximum prise par n correspond à une estimation minimum de q . n a toujours été trouvé inférieur à 2 ; le nombre *minimum* de récepteurs du substrat est donc deux. De plus, si l'on fait l'hypothèse vraisemblable qu'il existe un centre actif par protomère (*) de la molécule, le nombre de sous-unités constitutives de la molécule de L-thréonine désaminase doit être *au moins* égal à deux.

III. — *Action des effecteurs allostériques et des analogues du substrat sur l'inactivation de la L-thréonine désaminase de biosynthèse par l'urée.*

Si les effecteurs allostériques provoquent des modifications de la structure quaternaire (c'est-à-dire des forces d'association entre sous-

(*) Voir Discussion Générale, la signification du mot protomère.

unités) de la molécule de L-thréonine désaminase, *a priori*, ils doivent affecter l'équilibre d'agrégation induit par l'urée.

Il est remarquable de constater qu'il en est bien ainsi et que analogues du substrat et effecteurs allostériques modifient d'une façon spectaculaire les caractéristiques de l'équilibre d'inactivation (CHANGEUX [11]). La DL-allothréonine, analogue du substrat et la L-valine ou la L-norleucine, activateurs allostériques, déplacent l'équilibre en faveur de la forme inactive de l'enzyme. Au contraire, la L-isoleucine, l'inhibiteur allostérique, protège contre l'inactivation et provoque une *réactivation* partielle de l'enzyme (Fig. 8). Si les interprétations précé-

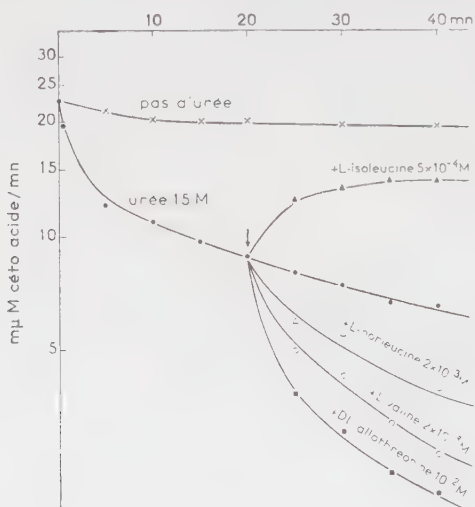


FIG. 8. — Action des effecteurs allostériques et d'un analogue du substrat sur la cinétique d'inactivation de la L-thréonine désaminase de biosynthèse par l'urée 1,5 M.

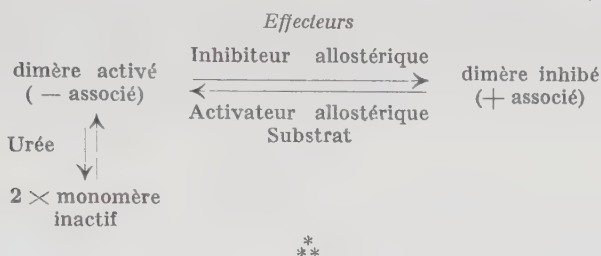
Mêmes conditions que celles décrites dans la figure 4, sauf pour les concentrations indiquées d'effecteurs. Température 27°C.

(D'après CHANGEUX [11]).

dentes sont exactes, on peut dire que, en présence d'urée, les activateurs allostériques stimulent la dépolymérisation de la L-thréonine désaminase, alors que l'inhibiteur allostérique, au contraire, protège contre celle-ci. La présence des effecteurs allostériques affecterait donc l'association des sous-unités de la molécule de L-thréonine désaminase : tantôt stabilisant cette association, tantôt la sensibilisant à la dépolymérisation par l'urée. A l'état activé et à l'état inhibé de l'enzyme correspondraient donc des *structures quaternaires* différentes de la molécule : l'état inhibé ayant une structure plus fortement associée que l'état activé.

L'interprétation générale la plus simple de cet ensemble d'observations est qu'il existe *spontanément* un équilibre entre deux états d'acti-

vité de la molécule et que les effecteurs allostériques ou le substrat déplacent cet équilibre en faveur de l'une ou l'autre forme.



Il n'est pas superflu d'insister sur le fait que, dans les expériences qui viennent d'être décrites, afin de maintenir les concentrations de ligand constantes et de ne pas être gêné par la transformation de la L-thréonine au cours du traitement par l'urée, nous avons délibérément remplacé le substrat par un de ses proches analogues structuraux : la L ou DL-allothréonine. Les observations suivantes nous autorisent à le faire.

1. — Nous savons que les cinétiques d'inhibition par l'allothréonine suivent les lois simples de HENRI et MICHAELIS ; il est donc légitime de les interpréter comme résultant de l'exclusion *directe* du substrat par l'allothréonine de tous les récepteurs actifs où celui-ci est susceptible de se fixer.

2. — Les courbes d'inhibition de la L-thréonine-désaminase par des concentrations croissantes de L-isoleucine, en présence ou en absence de L-allothréonine (Fig. 9) montrent clairement qu'il faut une concen-

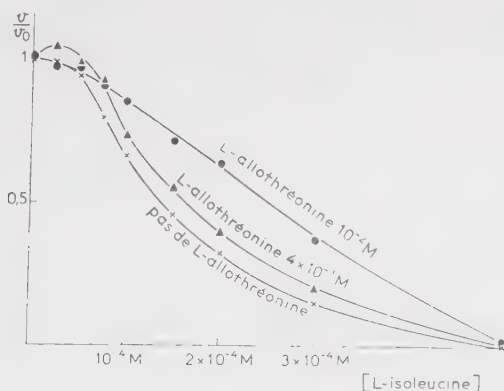


FIG. 9. — Inhibition de la L-thréonine désaminase de biosynthèse par des concentrations croissantes de L-isoleucine en présence de L-allothréonine.

Les courbes sont ramenées à une même vitesse initiale pour une concentration nulle en L-isoleucine. Essais suivant la méthode générale 40 $\mu\text{g/ml}$ en protéines d'un extrait brut dialysé d'une souche déréprimée : L-thréonine 2×10^{-2} M.

tration plus élevée de L-isoleucine pour atteindre 50 p. 100 d'inhibition lorsque de la L-allothréonine est présente dans le milieu d'essai que lorsqu'elle en est absente. Tout se présente comme si la concentration du substrat était accrue par la présence de L-allothréonine.

Ce dernier fait, allié au précédent, suggère que, *en première approximation*, la transition provoquée par la liaison de ce composé est assimilable à celle qui résulte de la fixation de la L-thréonine.

IV. — *Conclusions.*

Les cinétiques d'inactivation de la L-thréonine désaminase de biosynthèse par l'urée et l'action des effecteurs de contrôle et des analogues du substrat sur la cinétique d'inactivation par l'urée suggèrent que la liaison de l'enzyme avec les divers ligands pour lesquels il a de l'affinité, stabilise des transitions réversibles de la *structure quaternaire* de la molécule. Ces transitions, qui correspondent à des modifications des forces de liaisons entre les sous-unités constitutives de l'enzyme, ne sont pas, dans les conditions expérimentales utilisées, des transitions d'agrégation.

*
**

Les faits présentés dans ce chapitre soulignent l'importance de la *structure quaternaire* de la molécule de L-thréonine désaminase dans l'établissement et la transmission des interactions allostériques. Cette propriété, déjà exprimée à propos de la molécule d'hémoglobine, semble généralisable à l'ensemble des protéines allostériques.

En effet, il n'est pas de protéine de contrôle qui, après une analyse soignée, n'ait été reconnue constituée de sous-unités : ATCase (GERHART et PARDEE [15, 16]), ATP-PRPP-pyrophosphorylase (MARTIN [17]), homosérine déshydrogénase (PATTE et al. [18]) etc... et réciproquement il n'est pas, à notre connaissance, d'enzyme monomérique qui possède des propriétés indiscutablement allostériques.

De plus, dans les quelques cas où il est possible de dissocier une molécule allostérique en ses protomères ayant conservé une activité enzymatique, chaque fois la dissociation lui fait perdre ses propriétés allostériques (cf. GERHART et PARDEE [15, 16]).

L'action des effecteurs allostériques sur l'inactivation de la L-thréonine désaminase par l'urée nous a amené à assimiler le mécanisme intime des transitions allostériques à une variation des forces d'interaction entre les sous-unités constitutives de la molécule. Une interprétation de ce genre a été déjà fournie à propos des équilibres de fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine ; elle s'impose dans les quelques cas où les forces d'association entre sous-unités de la forme activée sont suffisamment faibles pour qu'une séparation physique entre sous-unités s'ensuive : hémoglobine de Lamproie en présence d'oxygène (BRIEHL [5], RUMEN [19]), homosérine-déshydrogénase de *Rhodospir-*

rillum rubrum en présence des activateurs allostériques (DATTA et al., [20]).

Cette propriété générale sera prise dans la discussion qui va suivre comme élément de base d'un modèle plausible de transition allostérique (MONOD et al. [21], CHANGEUX et al. [22]).

RÉSUMÉ.

1. Il n'y a pas d'effet des concentrations d'enzyme sur la sensibilité de la L-thréonine désaminase à la L-isoleucine. De plus, le coefficient de sédimentation de l'enzyme n'est pas affecté par la présence de l'effecteur régulateur. La transition allostérique n'est pas une transition d'agrégation.

2. En présence d'urée, un équilibre réversible s'établit entre une forme active et une forme inactive de l'enzyme. Diverses observations suggèrent que cette forme inactive de l'enzyme, obtenue en présence d'urée, est moins agrégée que la forme active. La L-isoleucine, inhibiteur allostérique, protège fortement contre l'inactivation par l'urée, la L-valine et la L-isoleucine, activateurs allostériques, et l'allothréonine, analogue du substrat, sensibilisent l'enzyme à l'inactivation. Ces résultats suggèrent que la liaison des divers ligands allostériques stabilise une transition réversible de la structure quaternaire de la molécule. Cette transition qui affecte la liaison entre les sous-unités de l'enzyme ne conduit pas, dans les conditions normales, à sa dissociation.

SUMMARY.

1. There is no effect of enzyme concentration on the sensitivity of L-threonine desaminase to L-isoleucine. Furthermore the sedimentation velocity of the enzyme is not affected by the presence of the regulatory effector. The primary event following the binding of L-isoleucine is not a transition of aggregation.

2. In the presence of urea a reversible equilibrium is established between an active and an inactive form of the enzyme. Indirect evidences suggest that the inactive form of the enzyme obtained in the presence of urea is less aggregated than the active one. L-isoleucine, the allosteric inhibitor strongly protects against inactivation by urea, L-valine and L-isoleucine the allosteric activators, and allo-threonine, a substrate analog, sensitize the enzyme to inactivation. These data suggest that the binding of the different allosteric ligands stabilize a reversible transition of the quaternary structure of the molecule. The transition which affects the bonding between enzyme subunits do not lead, in normal conditions, to the actual dissociation of the molecule.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Es besteht keine Wirkung der Enzym-Konzentration auf die Empfindlichkeit der L-Threonindeaminase gegenüber dem L-Isoleucin. Dazu wird die Sedimentationsgeschwindigkeit des Enzyms durch die Gegenwart

des regulierende Effektors nicht beeinflusst. Das erste Ereignis nach der Bindung des L-Isoleucins ist keine Transition des Aggregationszustands.

2. In Gegenwart von Harnstoff tritt ein reversibles Gleichgewicht zwischen einer aktiven und einer inaktiven Form auf. Indirekte Evidenz bringt auf den Gedanken, dass die inaktive Form des Enzyms weniger aggregiert als die aktive Form ist. Das L-Isoleucin, ein allosterischer Inhibitor, schützt bedeutend gegen die Inaktivierung durch Harnstoff ; das L-Valin und das L-Isoleucin, die allosterische Aktivatoren sind, und das Allo-Threonin, das ein Substrat-Analog ist, sensibilisieren das Enzym für die Inaktivierung. Durch diese Ergebnisse wird man auf den Gedanken gebracht, dass die Bindung der verschiedenen allosterischen Liganden die reversible Transition der quaternären Struktur des Moleküls stabilisiert. Diese Transitionen, welche die Bindung zwischen den Untereinheiten des Enzyms betreffen, führen nicht, unter normalen Bedingungen, zu ihrer tatsächlichen Dissoziation.

BIBLIOGRAPHIE.

1. WYMAN, J. — *Adv. in Protein Chem.*, 1948, 4, 407.
2. MUIRHEAD, H. et PERUTZ, M. F. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1963, 28, 451.
3. BENESCH, R. et BENESCH, R. E. — *J. Mol. Biol.*, 1963, 6, 498.
4. BENESCH, R. E., BENESCH, R. et WILLIAMSON, M. E. — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1962, 48, 2071.
5. BRIEHL, R. W. — *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 2361.
6. FRIEDEN, C. — *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 809.
7. YIELDING, K. L. et TOMKINS, G. M. — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1960, 46, 1483.
8. TOMKINS, G. M. et YIELDING, K. L. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1961, 26, 331.
9. MONOD, J., CHANGEUX, J. P. et JACOB, F. — *J. Mol. Biol.*, 1963, 6, 306.
10. MARTIN, R. G. et AMES, B. N. — *J. Biol. Chem.*, 1961, 236, 1372.
11. CHANGEUX, J. P. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1963, 28, 497.
12. FRIEDEN, C. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1963, 10, 410.
13. TALAL, N., TOMKINS, G. M., MUSHINSKI, J. F. et YIELDING, K. L. — *J. Mol. Biol.*, 1964, 8, 46.
14. TOMKINS, G. M., YIELDING, K. L., TALAL, N. et CURRAN, J. F. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1963, 28, 461.
15. GERHART, J. C. et PARDEE, A. B. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1964, 29, 727 (1964).
16. GERHART, J. C. et PARDEE, A. B. — *Fed. Proc.*, 23, 727 (1964).
17. MARTIN, R. G. — *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 257.
18. PATTE, J. C., LE BRAS, G., LOVINY, T. et COHEN, G. N. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1963, 67, 16.
19. RUMEN, N. M. — *Fed. Proc.*, 1963, 22, 681.
20. DATTA, P., GEST, H. et SEGAL, H. — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1964, 51, 125.
21. MONOD, J., WYMAN, J. et CHANGEUX, J. P. — 1965, à paraître dans *J. Mol. Biol.*
22. CHANGEUX, J. P., ULLMANN, A. et MONOD, J. — Colloque International du
23. CHANGEUX, J. P. — *Brookhaven Symp.*, 1964, 17, 232.
24. ULLMANN, A., VAGELOS, P. R. et MONOD, J. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1964, 17, 86.



Imprimerie M. DECLUME, Lons-le-Saunier.

SUR LES PROPRIÉTÉS ALLOSTÉRIQUES DE LA L-THRÉONINE DÉSAMINASE DE BIOSYNTHÈSE.

VI. — DISCUSSION GÉNÉRALE (*).

par Jean-Pierre CHANGEUX.

Institut Pasteur, Service de Biochimie cellulaire.

(Mémoire reçu le 10 juin 1964).

I. — RÉSUMÉ DES PRINCIPAUX FAITS ET INTERPRÉTATIONS.

L'interaction régulatrice élémentaire par laquelle la L-isoleucine gouverne le fonctionnement instantané de sa propre chaîne de biosynthèse s'effectue chez *Escherichia coli* K 12 au niveau de la L-thréonine désaminase de biosynthèse.

L'analyse des propriétés cinétiques de l'enzyme purifié a permis d'établir : 1) que la L-isoleucine est le seul aminoacide naturel à inhiber spécifiquement l'activité désaminasique et que les modalités de cette inhibition ont pour une grande part, les apparences d'une *exclusion mutuelle* entre la L-thréonine et la L-isoleucine ; 2) que les cinétiques d'action vis-à-vis de la L-thréonine et de la L-isoleucine ne suivent ni les lois simples de Henri et Michaelis, ni des lois strictement bimoléculaires. L'interprétation la plus simple de ces observations est que plusieurs molécules de substrat ou d'inhibiteur peuvent se fixer sur une molécule d'enzyme et que dans ces conditions des *interactions d'affinité* s'établissent entre les molécules de ligand ou leurs récepteurs : interactions *homotropes* entre molécules identiques (L-thréonine-L-thréonine ou L-isoleucine-L-isoleucine), toujours coopératives ; interactions *hétéotropes* entre molécules de structure différente (L-thréonine-L-isoleucine), dans le cas présent, antagonistes.

L'action des analogues structuraux de la L-thréonine et de la L-isoleucine sur l'activité de la L-thréonine désaminase a permis de souli-

(*) Cet article est le dernier d'une série de six, intégralement publiés dans ce bulletin (I et II, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1964, 46, 927 et 961 ; III, *id.*, 1964, 46, 1151 ; IV, *id.*, 1965, 47, 115 ; V et VI, *id.*, 1965, 47, 267 et 281. L'ensemble a constitué une thèse de Doctorat d'Etat soutenue le 25 Juin 1964 devant la Faculté des Sciences de Paris. Ce travail a bénéficié de l'aide du « Jane Coffin Childs Memorial Fund for Medical Research », des « National Institutes of Health », de la « Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique » et du « Commissariat à l'Energie Atomique ». Il n'aurait pas vu le jour sans l'aide précieuse des maîtres exceptionnels qu'ont été pour l'auteur Jacques MONOD et François JACOB ; qu'ils trouvent ici, ainsi que tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail, l'expression de son affectueuse reconnaissance.

gner la double spécificité de la molécule. La variabilité en sens opposé de l'affinité de l'enzyme en fonction du pH pour la L-thréonine et la L-isoleucine à laquelle s'ajoute l'existence d'analogues de la L-isoleucine et d'activateurs efficaces de l'enzyme, nous autorisent à interpréter l'interaction régulatrice hétérotrope comme une interaction *indirecte* qui s'établit *entre récepteurs distincts et spécifiques* (interaction « *allostérique* »). L'interaction entre la L-thréonine et la L-isoleucine n'est donc la conséquence ni d'une parenté structurale, ni d'une réactivité spéciale de ces molécules.

Diverses méthodes menant chacune à une altération discrète de la structure de l'enzyme ont rendu possible la perte de la sensibilité à la L-isoleucine tout en conservant l'activité désaminasique (phénomène de *désensibilisation*). De cette observation ainsi que de la perte *simultanée* des interactions homo- et hétérotropes au cours du processus de désensibilisation, il découle que la transmission des interactions allostériques s'effectue par l'intermédiaire de la molécule protéique et dépend de l'architecture d'ensemble de celle-ci.

Les cinétiques d'inactivation de la L-thréonine désaminase de biosynthèse par l'urée et l'action des effecteurs de contrôle et des analogues du substrat sur la cinétique d'inactivation par l'urée suggèrent que la liaison de l'enzyme avec les divers ligands pour lesquelles il a de l'affinité, stabilise des *transitions réversibles de la structure quaternaire* de la molécule. Ces transitions, qui correspondent à des modifications des forces de liaisons entre les sous-unités constitutives de l'enzyme, ne sont *pas* des transitions d'agrégation.

II. — PRÉSENTATION D'UN MODÈLE.

Il ressort du résumé qui vient d'être fait que les propriétés allostériques de la L-thréonine désaminase de biosynthèse, comme celles d'un grand nombre de protéines de contrôle, sont la conséquence d'une structure tridimensionnelle particulière de la molécule d'enzyme.

Une première hypothèse structurale possible est que *certaines liaisons chimiques participant au repliement sur elles-mêmes de la chaîne primaire interviennent d'une façon privilégiée dans l'établissement des interactions allostériques*. Cette hypothèse se trouve suggérée par la remarquable propriété qu'ont certains agents ou réactifs spécifiques d'interférer avec elles. Nous avons signalé l'effet des dérivés mercuriques : mis en présence de protéines de contrôle aussi différentes que l'hémoglobine, la L-thréonine désaminase, l'ATCase, la PRPP-ATP-pyrophosphorylase, ils déclenchent le même processus de désensibilisation. Doit-on dire pour cela que les groupes *thiols* ou les résidus *histidyls* spécifiquement bloqués par les dérivés mercuriques établissent des liaisons intramoléculaires qui sont les vecteurs spécifiques des interactions allostériques ? Cette suggestion conserverait sa vrai-

semblance s'il n'était clair que d'autres types de liaisons n'étaient mis en jeu avec apparemment autant de spécificité :

— des *forces d'interactions électrostatiques* : la sensibilité aux effecteurs de contrôle d'un grand nombre de protéines allostériques dépend d'une manière stricte du pH et de la force ionique ;

— des *forces d'interaction hydrophobes* : de nombreuses protéines de contrôle sont instables aux basses températures : L-thréonine désaminase de *Rhodospirillum rubrum* (DATTA et al. [1]), de certains mutants de *S. typhimurium* ou de *E. coli* (FREUNDLICH et UMBARGER [2], CHANGEUX, non publié) ; homosérine déshydrogénase de *E. coli* (PATTE et al. [3], COHEN et al. [4]). L'urée agit sur la sensibilité aux effecteurs allostériques de plusieurs d'entr'elles (ATCase (GERHART et PARDEE [5]). Certains colorants spécifiques des régions hydrophobes se fixent différemment en présence ou en l'absence d'effecteurs (hémoglobine (ANTONINI et al. [6]), phosphorylase b (CHANGEUX et al. [7], ULLMANN et al. [21]).

En fait, il suffit d'ajouter à cette liste les *liaisons hydrogènes* pour presque obtenir le catalogue des divers types de liaisons connues qui contribuent à la réalisation de la structure spatiale des molécules protéiques à partir de leur structure primaire. Il semble illusoire de chercher quel type de liaison est le plus directement impliqué, il est beaucoup plus logique de penser que toutes interviennent et que ce n'est pas leur nature mais leur *disposition dans l'espace* qui importe.

La seconde hypothèse structurale possible tient compte de cette remarque : s'il est vrai que les transitions allostériques s'accompagnent de modifications de la structure quaternaire de la molécule (cf. les expériences faites en présence d'urée sur la L-thréonine désaminase), il faut chercher dans le *mode d'association entre les sous-unités* constitutives de la molécule et dans les considérations de *symétrie* qui y sont relatives, les raisons de leur existence. Cette hypothèse a été énoncée, discutée en détail récemment sous forme d'un modèle théorique (MONOD et al. [8] et CHANGEUX et al. [7], CHANGEUX [22]). Les principales propositions qui vont être exposées maintenant en sont issues (pour une discussion approfondie se reporter à MONOD et al. [8]).

1) *Les protéines allostériques sont postulées être des oligomères (*) définis, résultant de l'assemblage d'un nombre limité de protomères (*) associés de façon telle que la molécule présente au moins un axe de symétrie.*

L'assemblage des sous-unités constitutives identiques ou protomères d'une molécule protéique, puisque stable et spécifique, ne se conçoit

(*) La terminologie relative aux protéines globulaires adoptée par CHANGEUX et al. [7] est la suivante :

a) Les protéines globulaires comprenant un nombre fini et relativement petit de sous-unités *identiques* sont dites *oligomères* ;

b) le terme de *protomère* sera employé pour désigner les sous-unités identiques associées dans une protéine oligomère ;

c) le terme de *monomère* désigne le protomère à l'état dissocié.

que si les liaisons qui assurent cette association (dans la majorité des cas non covalentes) sont nombreuses et organisées en surface complémentaires ayant entr'elles une affinité élevée (au même titre qu'un récepteur enzymatique et son substrat). Dans ces conditions, tout assemblage menant à la construction d'une molécule contenant un nombre fini et déterminé de protomères s'opère par des surfaces qui contiennent leur propre complémentarité (surfaces antiparallèles). La molécule ainsi construite possède nécessairement un axe de répétition d'ordre deux (dyad axis).

En effet, si l'on suppose que l'association entre protomères s'effectue par des régions du protomère simplement complémentaires l'une de l'autre et topographiquement distinctes, il n'y a pas de raison pour que l'on aboutisse à un polymère fini ; au contraire les polymères construits de cette façon seront indéfinis et de structure hélicoïdale (protéines fibreuses : collagène, myosine...). Cette règle souffrirait d'une exception si l'orientation des aires d'appariement était telle que la chaîne se referme sur elle-même, dans ces conditions, il est aisé de voir que l'oligomère obtenu serait lui aussi symétrique.

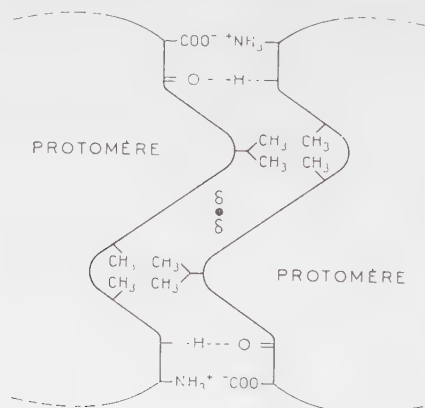


FIG. 1. — Représentation schématique du mode d'appariement des protomères dans un dimère.

Le plan de la figure est équatorial, il est perpendiculaire à l'axe de répétition d'ordre deux $\delta\delta$ du dimère.

Explications dans le texte.

La figure 1 représente le mode d'association d'un protomère avec lui-même dans un oligomère qui est ici un dimère. Les surfaces d'association sont antiparallèles et les liaisons qui stabilisent l'association entre protomères sont répétées deux fois dans la zone de contact. Le dimère possède un axe de répétition $\delta\delta$ qui est ici perpendiculaire au plan de la figure.

Ce résultat peut être généralisé, et faire l'hypothèse que les *protéines allostériques* sont des oligomères revient à dire que *leur molécule possède au moins un axe de symétrie*.

Le protomère dans le cas le plus simple est constitué par une seule chaîne polypeptidique (protomère monocaténaire); elle peut aussi résulter de l'assemblage de plusieurs chaînes différentes (protomère polycaténaire).

2) *Chaque protomère d'une molécule allostérique porte un et un seul récepteur stéréospécifique complémentaire de chaque catégorie de ligand avec lequel l'enzyme établit des complexes réversibles.*

Dans la majorité des cas où la numération des récepteurs stéréospécifiques par molécule a pu être réalisée (cf. SCHACHMAN, [9]), il existe une nette corrélation entre ce nombre et celui des protomères constitutifs de la molécule. Seules exceptions apparentes :

1) les enzymes dont les « sous-unités » ne sont pas des protomères mais des chaînes polypeptidiques ; de tels enzymes doivent être considérés comme des monomères et l'on ne s'attend pas à ce que le nombre de récepteurs spécifiques se superpose à celui des chaînes.

2) les monomères qui possèdent un nombre relativement élevé de récepteurs pour un ligand donné (la sérum albumine par exemple) ; en fait les récepteurs dont il est question ne sont pas homologues et ne sont pas non plus stéréospécifiques.

3) *Une molécule allostérique peut prendre réversiblement plusieurs états conformationnels distincts.* Ces états diffèrent entre eux :

a) par le nombre, la distribution ou l'énergie des liaisons entre protomères ;

b) par leur affinité à l'égard du ou des ligands stéréospécifiques.

Lorsque la protéine passe d'un état conformationnel à un autre, sa symétrie est conservée.

Plaçons-nous dans le cas simple d'un dimère. En première approximation on peut admettre que seuls deux états de la molécule sont à considérer : un état relâché (R), un état contraint (T) (Fig. 2). La conformation des protomères dans l'état relâché est plus voisine de la conformation qu'adopteraient ces protomères à l'état de monomère. Cet équilibre est réversible et l'on écrit :



Soit L la constante de cet équilibre ; c'est une constante intrinsèque de la protéine considérée, nous l'appellerons « constante allostérique ».

Si l'un des états a de l'affinité pour un ligand et pas l'autre on peut écrire :



$TF + F \rightleftharpoons FTF$ par raison de symétrie TF est identique à FT et la constante de ce nouvel équilibre est k_F la même que celle du précédent équilibre ;

ainsi que : $R + S \rightleftharpoons RS$ avec k_s

$RS + S \rightleftharpoons SRS$ avec k_s pour les mêmes raisons.

Les équations donnant la fraction de récepteurs liés ($\bar{Y}$) tant avec S ($\bar{Y}_S$) qu'avec F ($\bar{Y}_F$) en fonction des concentrations de substrat ou d'effecteur peuvent être écrites (MONOD *et al.* [8], CHANGEUX *et al.* [7]).

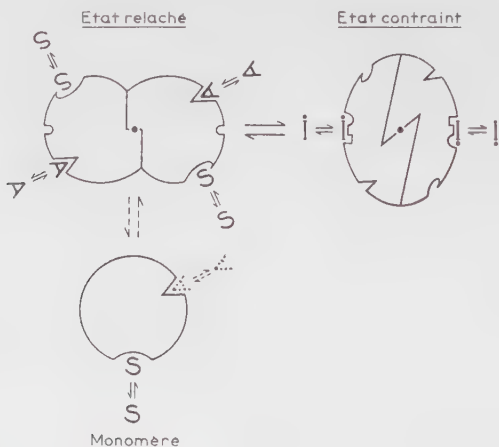


FIG. 2. — Représentation schématique d'un modèle plausible de transition allostérique.

Explication dans le texte.

Pour un dimère, dans chaque cas, l'équation a une forme *quadratique*. En faisant l'hypothèse que la *symétrie de la molécule est conservée* lorsqu'elle passe d'un état conformationnel à un autre, l'existence d'interactions *homotropes* (tant entre S que F), propriété spécifique des protéines allostériques devient directement prévisible.

En assignant à chacun des états symétriques R et T des affinités différentes pour plusieurs ligands les interactions *hétérotropes* sont là encore prévues.

III. — DISCUSSION DU MODÈLE.

A— La reconnaissance directe des propriétés de symétrie d'une protéine allostérique ne semble, à l'heure actuelle, accessible à l'expérience que par les méthodes de diffraction des rayons X.

Elle a été réalisée dans le cas unique de l'hémoglobine. PERUTZ et ses collaborateurs ont établi :

- 1) que la molécule possède un axe de répétition d'ordre deux ;
- 2) que les états conformationnels distincts pris par la molécule lorsqu'elle est oxygénée ou réduite sont l'un comme l'autre des états symétriques.

La symétrie de la molécule d'hémoglobine est donc bien conservée par la transition allostérique.

Nous ne possédons évidemment pas de preuves aussi directes avec la L-thréonine désaminase de biosynthèse. L'identification d'une structure oligomérique, c'est-à-dire résultant de la répétition d'un même protomère, constituerait cependant une première suggestion en faveur de la présence d'axe de répétition dans la molécule associée. Cela n'a pas encore pu être démontré mais nous savons que l'urée scinde la molécule de L-thréonine désaminase en plusieurs unités dont la cinétique de réassociation en enzyme actif est du second ordre. Ce fait est compatible avec une structure de la molécule en dimère symétrique.

L'analyse fine du gène de structure de l'ATP-PRPP-pyrophosphorylase (AMES et HARTMAN [11]) et les données de MARTIN [12] suggèrent qu'une structure du même type pourrait être aussi réalisée dans le cas du premier enzyme spécifique de la synthèse de l'histidine chez *E. coli*.

Une seconde proposition très précise du modèle qui puisse donner lieu, elle aussi, à une vérification expérimentale directe concerne le nombre de récepteurs stéréospécifiques par protomère. Cette numération a pu être faite, nous l'avons dit, pour un certain nombre de protéines allostériques (cf. SCHACHMAN [9] et GERHART et PARDEE [13, 14]) et il semble de règle qu'effectivement, il y ait par molécule autant de récepteurs d'une catégorie donnée qu'il y a de protomères.

B — Le principal mérite du modèle proposé est de tenter de déduire des propriétés cinétiques exceptionnelles des protéines allostériques à partir des propriétés de symétrie de leur molécule ; pour ce faire l'hypothèse a été formulée que toute molécule allostérique existe spontanément sous *au moins* deux formes symétriques et en équilibre réversible ($R \rightleftharpoons T$). Chacune d'elles posséderait des propriétés d'activité et (ou) d'affinité différentes à l'égard du substrat et des divers effecteurs ; la même transition serait responsable à la fois des interactions homotropes et des interactions hétéotropes.

I. — Une première prédiction est qu'il existe une corrélation *nécessaire entre la présence d'une interaction hétérotrope et la présence simultanée d'interactions homotropes*.

Nous avons déjà souligné que les enzymes allostériques se classent assez bien en deux catégories : ceux pour lesquels l'interaction hétérotrope affecte *principalement l'affinité* apparente (système K) pour le substrat et ceux pour lesquels elle affecte *principalement l'activité moléculaire* (système V).

Système K : les formes R et T ont des affinités différentes pour le substrat et le ou les effecteurs, la présence de l'effecteur modifie l'affinité apparente de la protéine pour le substrat et réciproquement : Sont à prévoir des interactions *homotropes du substrat* et des *interactions homotropes des effecteurs* ; c'est effectivement ce que l'on

observe dans le cas de la L-thréonine désaminase de biosynthèse et dans la majorité des exemples cités plus haut.

Système Vmax : le substrat a la même affinité pour les formes R et T, l'activité de chacune d'elle diffère, une seule forme fixe l'effecteur avec une affinité appréciable : sont à prévoir des interactions *homotropes de l'effecteur* mais *pas* d'interactions homotropes du substrat ; là encore c'est ce qui est observé dans la majorité des exemples cités plus haut.

2. — Une seconde prédiction, corollaire de la précédente, est que les formes R et T sont des états possibles de la molécule qui, au moins potentiellement, préexistent à la fixation d'un ligand. Celui-ci en se fixant ne provoque pas l'apparition d'une structure nouvelle mais stabilise une structure potentielle. Si ces deux états symétriques de la molécule sont seuls possibles, les transitions provoquées par des composés de structure différente mais ayant de l'affinité pour une même forme (R ou T) doivent être les mêmes. Tout effecteur ayant de l'affinité pour la forme la plus active ou ayant l'affinité maximum pour le substrat sera un activateur, tout effecteur stabilisant l'autre forme sera inhibiteur. Dans ces conditions on doit s'attendre à ce que les *interactions homotropes du substrat lorsqu'elles existent varient avec les concentrations d'effecteur* et symétriquement que les *interactions homotropes de l'effecteur mesurées en présence de substrat puissent varier avec la concentration de substrat*. Dans le cas d'un système K on s'attend à ce que le coefficient n (de l'équation de Hill) d'interactions du substrat s'accroisse en présence d'un effecteur d'inhibition, diminue en présence d'un effecteur d'activation ; on s'attend aussi à ce que le coefficient n' d'interaction d'un effecteur d'activation diminue lorsque la concentration de substrat s'accroît tandis que dans les mêmes conditions le coefficient n' d'un effecteur d'inhibition varie en sens inverse.

TABLEAU I.

Variation des coefficients d'interactions homotropes de la L-thréonine désaminase de biosynthèse avec les concentrations de divers ligands spécifiques.

	n (L-thréonine)		n' (L-isoleucine)
Pas d'effecteur	1,39	L-thréonine 5×10^{-3} M	1,04
		L-thréonine 2×10^{-2} M	1,72
L-norleucine 10^{-3} M	0,93	L-thréonine 5×10^{-3} M	2,05
		+ L-norleucine 10^{-3} M	

Les coefficients d'interactions homotropes de la L-thréonine (n) et de la L-isoleucine (n') sont déterminés *en présence de substrat* à l'aide de la construction de Hill. Les données expérimentales sont les mêmes que pour les figures 3, 4 et 5.

Sur la L-thréonine désaminase de biosynthèse nous avons pu vérifier (Tableau I) :

— que le coefficient n d'interactions homotropes de la L-thréonine est plus faible mesuré en présence de L-valine ou de L-norleucine qu'en leur absence (Fig. 3) ;

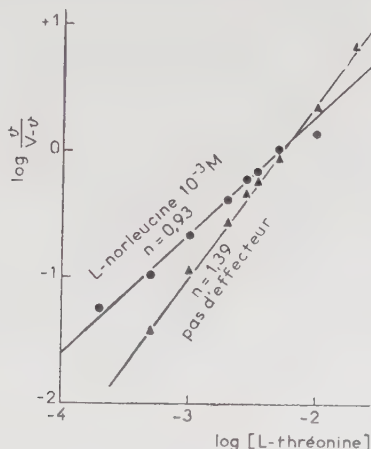


FIG. 3. — Action de la L-norleucine sur les interactions homotropes de la L-thréonine.

Les données expérimentales de la figure 15 art. III sont portées ici dans le système de coordonnées de HILL.

— que les interactions homotropes de la L-isoleucine apparentes aux concentrations saturantes (2×10^{-2} M) de L-thréonine ne le sont pas

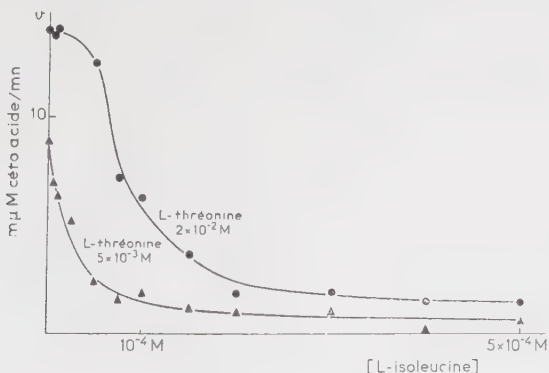


FIG. 4. — Action des concentrations de la L-thréonine sur les interactions homotropes de la L-isoleucine.

Essais dans les conditions suivantes : phosphate de potassium 10^{-1} M pH 7,7, phosphate de pyridoxal 10 μ g/ml et 38 μ g/ml d'un extrait brut d'une souche déréprimée, 27°C.

aux faibles concentrations de substrat (5×10^{-3} M) (Fig. 4) mais réapparaissent en présence d'un activateur allostérique (Fig. 5).

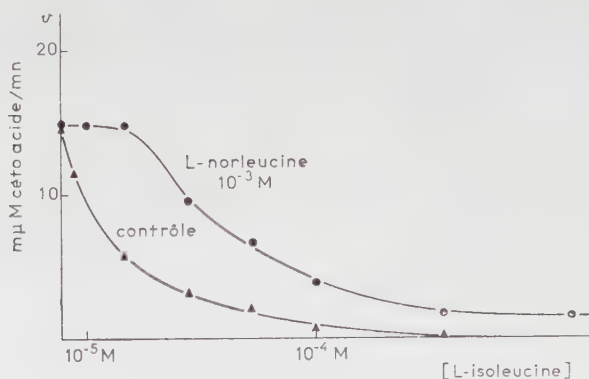


FIG. 5. — Action de la L-norleucine sur les interactions homotropes de la L-isoleucine.

Mêmes conditions que pour la figure 4, concentration de L-thréonine 5×10^{-3} M.

Ces quelques données cinétiques, relatives à la L-thréonine désaminase ne sont pas uniques : s'y ajoutent celles relatives à l'ATCase, la phosphofructokinase etc... Celles-ci comme celle-là s'interprètent simplement en supposant que les divers ligands agissent sur l'enzyme en *déplaçant un équilibre réversible* existant entre deux états de la molécule pour lesquels ils ont des affinités différentes.

D'une manière générale on s'attend à ce que la *forme* des courbes de saturation dépende :

- 1) de l'affinité *relative* du ligand considéré pour les formes R et T et non de son affinité absolue ;
- 2) de l'état d'équilibre spontané existant entre les formes R et T c'est-à-dire de la constante allostérique L.

La première de ces hypothèses prévoit l'existence de ligands qui bien qu'ayant des affinités intrinsèques différentes pour un même récepteur puissent avoir des coefficients d'interactions homotropes très voisins.

C'est très vraisemblablement le cas des proches analogues de la L-isoleucine : N-acétyl, L-isoleucine, L-isoleucine méthyl ester, L-isoleucine hydantoïne, dont les courbes d'action en présence de concentrations saturantes de substrat sont tracées sur la Fig. 6 dans le système de coordonnées de Hill. Leur coefficient d'interactions homotropes mesuré dans ces conditions est voisin de 2 (celui de la L-isoleucine). Sur cette figure sont aussi représentées les courbes d'action de la L-allithréonine et de la DL-allothréonine, analogues non pas de l'inhibiteur allostérique mais du substrat. Si ceux-ci stabilisent la même

forme R ou T que le substrat on ne s'attend pas, si le modèle est exact, à ce que en présence de concentrations saturantes de substrat des interactions homotropes de ces analogues soient décelées. C'est effectivement ce qui est observé.

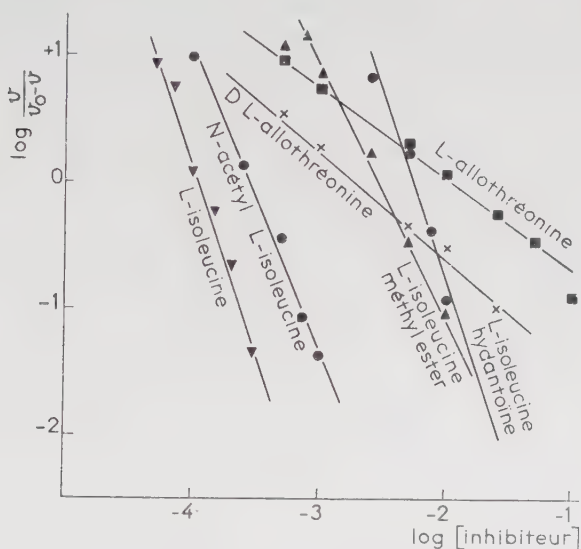


FIG. 6. — Courbes d'inhibition de la L-thréonine désaminase par des concentrations croissantes de divers analogues de la L-isoleucine et de la L-thréonine tracées dans le système de coordonnées de Hill.

Mêmes données expérimentales que pour les figures 4 et 7, art. III.

Envisageons maintenant la seconde hypothèse : les diverses interactions allostériques dépendent de la valeur de la constante L d'équilibre spontané entre les formes R et T.

Plaçons-nous encore dans le cas d'un système K : la thréonine désaminase de biosynthèse par exemple.

Si L est petit, c'est-à-dire si les conditions de mesure sont telles que l'équilibre est par exemple déplacé spontanément en faveur de la forme ayant l'affinité maximum pour le substrat, il ne sera pas possible de déceler d'interactions homotropes de la L-thréonine mais les interactions homotropes de la L-isoleucine seront maximum : c'est peut être ce qui se présente lorsque le pH du milieu d'incubation est voisin de 8,5.

Si L est grand, par contre, la forme favorisée a l'affinité maximum pour l'inhibiteur, les interactions homotropes de la L-thréonine sont présentes et les interactions homotropes de la L-isoleucine ne s'observent qu'en présence de substrat et à des concentrations saturantes de celui-ci ; or, aux pH voisins de 7,7 pour lesquels sont mises en évi-

dence des interactions homotropes de la L-thréonine c'est précisément ce que l'on trouve : en présence de L-thréonine 2×10^{-2} M le coefficient n' d'interactions de la L-isoleucine est voisin de 2 ; en son absence, la loi de fixation de la L-isoleucine, telle qu'elle est déterminée en suivant son effet protecteur contre l'inactivation thermique, suit l'isotherme de Langmuir. Une prédiction directe de modèle proposé se trouve donc une fois de plus intégralement vérifiée (Fig. 7).

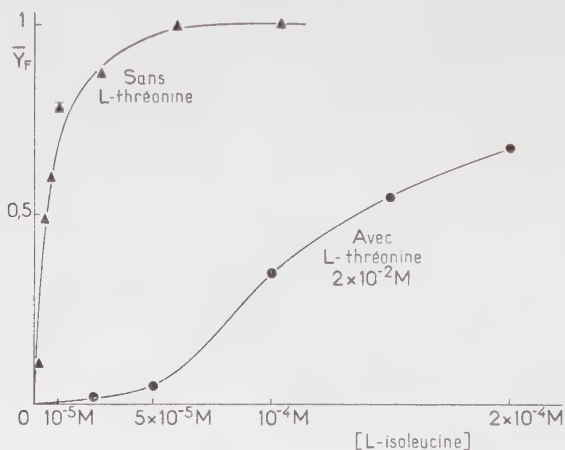


FIG. 7. — Action de la L-thréonine sur la courbe de variation de la fraction de récepteurs liés à la L-isoleucine ($\bar{Y}_F$) en fonction des concentrations de L-isoleucine.

Les valeurs expérimentales utilisées sont celles des figures 6 art. n° II et 10 art. n° III.

3. — Une autre prédiction du modèle proposé est qu'il doit être possible par divers traitements de l'enzyme de bloquer la transition $R \rightleftharpoons T$ et par là de déplacer irréversiblement l'équilibre en faveur de l'une ou l'autre forme. De tels traitements, qui figent la molécule dans l'un des deux états R ou T, doivent entraîner, comme cela a été décrit à propos du phénomène de désensibilisation, la perte simultanée des interactions homo et hétérotropes.

Dans la plupart des exemples cités la désensibilisation se comprend comme un déplacement irréversible en faveur de la forme la plus active ou ayant l'affinité maximum pour le substrat. Dans le cas d'un système K (la L-thréonine désaminase de biosynthèse de *E. coli*, l'ATCase de *E. coli*...) il est prévu par le modèle que dans les conditions où existent les interactions homotropes du substrat la désensibilisation provoque une augmentation de l'affinité apparente pour le substrat et une diminution de celle pour l'inhibiteur ; dans le cas d'un système V (homosérine déshydrogénase de *E. coli*...) le modèle prévoit que l'affinité pour le substrat ne change pas, mais par contre que l'af-

finité pour l'effecteur d'inhibition diminue et que l'activité moléculaire s'accroisse. Plusieurs de ces prédictions (CHANGEUX [15, 7], GERHART et PARDEE [5, 13, 14], PATTE et al. ont été vérifiées [3]).

Le modèle permet de prédire un autre type de désensibilisation que celui précédemment décrit et interprété : il serait constitué par le déplacement irréversible de l'équilibre $R \rightleftharpoons T$ non plus en faveur de la forme ayant l'affinité ou l'activité maximum pour le substrat, mais au contraire en faveur de l'autre forme. Ce phénomène conduirait pour les enzymes de type K à une préparation ayant l'affinité maximum pour l'inhibiteur, minimum pour le substrat et qui aurait aussi perdu ses interactions allostériques. C'est peut-être le cas de la thréonine désaminase extraite de *Rhodospirillum rubrum* qui possède une affinité intrinsèque pour la L-isoleucine plus de 100 fois supérieure à celle mesurée en présence de substrat [GEST et CHANGEUX (non publié)]. Pour les enzymes de type V la préparation obtenue conserverait son affinité pour l'inhibiteur allostérique mais serait peu ou pas active. Une molécule ayant de telles propriétés serait évidemment difficile à détecter.

Cette interprétation du phénomène de désensibilisation qui entre parfaitement dans le cadre du modèle proposé ne prévoit pas nécessairement qu'un changement de l'état d'agrégation de la molécule soit associé à la désensibilisation d'une protéine allostérique. Elle prévoit au contraire qu'une forme désensibilisée puisse avoir un coefficient de sédimentation très voisin de celui de la forme active : c'est précisément ce que l'on observe avec la L-thréonine désaminase de biosynthèse (Tableau II). Il va de soi cependant que la séparation en

TABLEAU II.

Coefficients de sédimentation de la L-thréonine désaminase de biosynthèse de plusieurs préparations différentes déterminées par la méthode de centrifugation en gradient de saccharose.

	s
1. Enzyme de type sauvage	8,1
2. Enzyme de type sauvage à pH 10,45.	7,55
3. Fraction purifiée partiellement désensibilisée	8,0
4. Fraction désensibilisée par $HgCl_2$	8,0
5. Mutant désensibilisé 4/16	7,8
6. Mutant désensibilisé 3/16	8,35

Mêmes conditions que pour la Figure 2 Art. V, sauf concentration en phosphate de potassium 1 M pH 8,1. La fraction désensibilisée par $HgCl_2$ a été centrifugée en l'absence de chlorure mercurique.

monomères actifs qui s'observe dans quelques cas (ATCase, homosérine déshydrogénase) à la suite du traitement désensibilisateur ne s'oppose

pas à une telle interprétation : c'est une des façons possibles de déplacer irréversiblement l'équilibre entre les formes R et T.

4. — Le modèle tel qu'il a été exposé ne prévoit pas laquelle des formes relachée (R) ou contrainte (T) est la forme ayant l'activité ou l'affinité maximum pour le substrat. Les deux éventualités sont possibles. Nous avons démontré Chapitre V à partir des expériences d'inactivation de la L-thréonine désaminase par l'urée en présence des effecteurs allostériques que dans ce cas la *forme ayant l'affinité la plus élevée pour le substrat est la forme relachée de l'enzyme* (Fig. 2). Il est remarquable de constater que dans les quelques cas où cette identification a été menée à bien, la même solution se rencontre, (GERHART et PARDEE [13, 14], WYMAN [16, 17]).

Par exemple avec l'ATCase il est possible de dissocier la molécule en monomères sans perdre d'activité. D'après le modèle chaque monomère doit adopter une structure plus voisine de la structure du protomère dans l'état relaché que dans l'état contraint de l'oligomère. Dans l'hypothèse où l'état relaché possède l'affinité la plus élevée pour le substrat, on doit s'attendre à ce que le monomère ait d'emblée, en l'absence d'interactions homotropes, l'affinité maximale. Or c'est bien ce que l'on observe (GERHART et PARDEE, [13, 14]).

D'une manière générale il apparaît que pour les quelques systèmes retro-inhibés étudiés jusqu'à présent ainsi que pour l'hémoglobine la forme la plus associée, *contrainte*, est la moins active. De plus, il semble pour les mêmes systèmes que l'équilibre entre les formes R et T se trouve fréquemment, dans les conditions normales, spontanément déplacé en faveur de la forme contrainte de sorte que pour se fixer le substrat a à vaincre les forces d'interactions entre sous-unités (interactions « négatives ») qui maintiennent la molécule sous son état contraint. Tout se présente donc comme si ces molécules hautement agrégées avaient été sélectionnées, à partir d'unités plus petites (de monomères) et sans doute déjà enzymatiquement actives, non pas pour être plus actives mais pour l'être moins !

IV. — CONCLUSIONS.

Le modèle de conservation de symétrie qui vient d'être décrit et discuté dans ses grandes lignes (pour une analyse détaillée le lecteur est prié de se référer aux mémoires de MONOD et al. [8] et CHANGEUX et al. [7]) a le mérite de donner une interprétation cohérente non seulement des propriétés de la L-thréonine désaminase de biosynthèse mais aussi de la plupart des systèmes faisant l'objet d'effets allostériques. Il va de soi qu'il ne s'agit là que d'une première approximation de la réalité. On pourrait en effet citer à sa charge des protéines de contrôle dont les propriétés cinétiques n'entrent pas à première vue dans le cadre des prédictions du modèle :

1) Il est prévisible que la distinction absolue faite entre systèmes K et systèmes V doit être mise en défaut par des systèmes mixtes pour lesquels les effets allostériques portent à la fois sur l'affinité et l'activité de la molécule : l'existence de tels systèmes ne pourraient évidemment pas servir d'argument pour rejeter le modèle.

2) Il n'est pas exclu que dans certains cas la liaison d'un effecteur allostérique s'accompagne d'effets irréversibles, conséquences par exemple de l'établissement de liens covalents entre le ligand et l'enzyme ou bien encore entre les unités constitutives de l'enzyme. Une conversion irréversible de ce type pourrait intervenir par exemple lors de l'incubation prolongée de la glycogène synthétase en présence d'ATP et de glucose 6-phosphate (TRAUT et LIPMANN [18]). Il va de soi que de tels effets ne peuvent s'intégrer simplement dans la discussion d'effets exclusivement *réversibles*.

3) Enfin il est clair que au niveau de protéines *monomériques* peuvent s'établir des interactions d'affinités entre plusieurs molécules de ligands (c'est le cas par exemple de la sérumalbumine : cf. SCHACHMAN [9]). Le modèle proposé, au contraire, établit un lien de causalité entre l'état oligomérique et la présence d'interactions homotropes.

Les interactions indirectes de ce type s'effectuant nécessairement entre groupes *non homologues* de la molécule, on s'attend à ce que soient simultanément présentes interactions homotropes et hétéotropes. Il n'est pas impossible que de tels effets aient à jouer un rôle physiologique, il n'en existe cependant pas, pour l'instant, d'exemple clairement défini.

Cette remarque nous amène à envisager comme possible que de tels effets puissent se superposer aux effets proprement allostériques, c'est-à-dire avec effets qui conservent la symétrie de la molécule (*). Elle confirme le caractère schématique et peut être simpliste du modèle proposé mais elle n'en exclut pas la généralité.

Une des vertus les plus singulières de ce modèle est d'apporter peut-être un début de justification de l'état polymérique d'un grand nombre de molécules protéiques. Nous ne voulons pas dire que tout oligomère est nécessairement allostérique. Nous voulons seulement souligner le fait que ce modèle associe très précisément la réalisation d'un état oligomérique à l'existence d'interactions régulatrices spécifiques au niveau d'une molécule. En d'autres termes l'état agrégé d'une molécule permet l'organisation de récepteurs stéréospécifiques topographiquement distincts et l'accessibilité à plusieurs états conformationnels relativement peu différents par leur énergie potentielle mais suffisamment importants pour assurer la propagation de *signaux intramoléculaires* par l'intermédiaire d'une transition de structure.

(*) Il n'est pas exclu que certains effets non compétitifs de la L-valine qui ne sont pas directement prévus par le modèle présenté plus haut puissent être interprétés dans ce sens.

D'autre part, ce modèle met en relief le fait que au moins pour certaines protéines, la réalisation des structures tertiaire et quaternaire puisse ne pas dépendre seulement de leur structure primaire mais soit sous le contrôle de signaux spécifiques. L'expression d'une *structure génétique* peut donc être l'objet d'une *régulation au niveau de la réalisation de la structure quaternaire* de la molécule dont elle détermine la séquence.

Dans les exemples cités les signaux régulateurs sont des métabolites, voire des hormones. Il est évidemment tentant d'imaginer que ces signaux puissent être, non pas des petites molécules, mais des macromolécules et pourquoi pas, d'autres protéines. Cela nous amène à envisager le niveau d'organisation immédiatement supérieur au niveau moléculaire : celui des structures intracellulaires ; doit-on penser que l'état d'activité de certains enzymes inclus dans une structure (membranaire par exemple) puisse être sous la dépendance d'un tel environnement ?

C'est certainement s'engager dans des spéculations pour l'instant difficiles à éprouver par l'expérience que d'essayer de reconnaître dans les phénomènes *membranaires* qui donnent lieu à la fois à la reconnaissance de signaux métaboliques stéréospécifiques et à leur transmission (la transmission synaptique par exemple) des mécanismes analogues à ceux décrits à propos des protéines allostériques.

EPILOGUE.

Les faits présentés dans cette série d'articles consacrés à la L-thréonine désaminase de biosynthèse de *E. coli* ont été décrits et discutés avec l'arrière pensée de justifier un modèle moléculaire plausible d'interaction régulatrice élémentaire.

Nous avons délibérément passé sous silence la signification physiologique de beaucoup d'entr'eux.

Faut-il insister sur l'importance de la stricte spécificité du récepteur d'inhibition que seul parmi tous les acides aminés naturels la L-isoleucine est appelée à reconnaître ? Doit-on souligner l'existence d'un contrôle positif par la L-valine produit d'une chaîne métabolique connexe (*) de celle de la L-isoleucine qui semble répondre à la nécessité d'un équilibre entre les pools de L-isoleucine et de L-valine chez *E. coli* K 12 (cf. UMBARGER et BROWN [19]) ? Est-il nécessaire de remarquer que l'existence d'interactions homotropes du substrat comme de l'inhibiteur de contrôle rend les effets de ces métabolites tributaires de seuils d'action qui doivent permettre un contrôle très étroit de leurs concentrations intracellulaires ?

(*) Des interférences régulatrices de ce type ont pu être utilisées avec, bien entendu, des hypothèses supplémentaires, pour construire des modèles de circuit pouvant intervenir au cours des processus de différenciation cellulaire (cf. MONOD et JACOB [20]).

Chacun de ces faits, on pourrait en citer bien d'autres, met en lumière la parfaite adaptation de la molécule du L-thréonine désaminase à sa fonction régulatrice.

Or l'existence de ces propriétés qui, *a posteriori*, nous apparaissent à la fois si exceptionnelles et si nécessaires dépend, en dernière analyse, d'une organisation particulière de la molécule d'enzyme en récepteurs spécifiques et distincts et en oligomère symétrique.

Le processus évolutif menant à partir d'une séquence arbitraire d'acides aminés à la réalisation d'un oligomère symétrique, c'est-à-dire à la présence sur un protomère de surfaces d'association ayant des propriétés de géométrie extrêmement strictes (Fig. 2) pourrait paraître inconcevable si nous n'avions fait la remarque que dans le *dimère associé* chaque liaison de la zone de contact entre protomère est répétée deux fois. Toute mutation portant sur un acide aminé localisé dans l'aire présumée d'association, si elle provoque l'apparition d'une liaison favorable à l'association, entraîne du *même coup* dans le dimère l'existence de *deux* fois cette liaison et aux *bonnes distances*. Au contraire, il faudrait *deux mutations* favorables et par surcroît portant sur des acides aminés situés aux distances convenables pour aboutir au même résultat en partant d'un dimère qui ne serait pas antiparallèle. Si la forme associée est fonctionnellement avantageuse, la stabilisation du dimère symétrique sera donc la plus rapide. La surface d'appariement de l'unité d'association acquerra par ce moyen ses propriétés de symétrie exceptionnelles (Moxon *et al.* [8]).

Il est donc plausible de concevoir la genèse des propriétés régulatrices spécifiques des protéines allostériques à partir d'unités moins agrégées, par le jeu de mutations susceptibles d'affecter leur association avec elles-mêmes.

De plus, le spectre très varié des courbes d'action obtenues à partir de diverses molécules de L-thréonine désaminase altérées par mutation (Fig. 12 Art. IV) laisse penser que les potentialités évolutives de telles molécules restent grandes. Il est donc concevable que par un mécanisme mutationnel suivi d'une stricte sélection il soit possible d'obtenir ce qui suscitait notre étonnement : l'ajustement extrêmement fin des de la régulation intracellulaire.

RÉSUMÉ.

L'analyse et la comparaison des propriétés de la L-thréonine désaminase avec celles des diverses protéines régulatrices connues mènent à la conclusion que l'interaction régulatrice élémentaire par laquelle un effecteur régulateur gouverne une activité enzymatique, n'est pas interprétable en termes d'interactions directes entre substrat et effecteur.

Il semble acquis que les interactions régulatrices s'établissent entre récepteurs spécifiques topographiquement distincts (effets allostéri-

ques) et sont transmises par l'intermédiaire d'un changement de conformation de la molécule (transition allostérique).

Il est remarquable que la plupart des systèmes allostériques connus possèdent la propriété de transmettre des interactions non seulement entre ligands différents tels que entre un substrat et un activateur ou entre un substrat et un inhibiteur mais encore entre ligands identiques. Ces effets homotropes sont invariablement coopératifs tandis que les interactions entre ligands différents (effets hétéotropes) peuvent être coopératifs ou antagonistes.

L'interprétation des effets homotropes apparaît particulièrement intéressante et requiert des hypothèses spécifiques. Un modèle a été proposé par MONOD, WYMAN et CHANGEUX [8] pour interpréter d'abord ce dernier type d'effet. Ce modèle est fondé sur l'hypothèse suivant laquelle les protéines allostériques doivent la propriété de transmettre les interactions homotropes à l'état oligomérique de leur molécule (la molécule résulte de l'association de sous-unités identiques en nombre limité et possède au moins un axe de symétrie). De plus l'hypothèse est faite que les oligomères allostériques existent sous au moins deux états conformationnels distincts pour lesquels la symétrie de la molécule et aussi la symétrie des récepteurs est conservée. Enfin il est fait l'hypothèse que l'affinité des récepteurs pour chacun des ligands varie quand la protéine passe d'un état à l'autre.

Sur cette base, il devient possible de rendre compte non seulement des interactions homotropes mais aussi des interactions hétéotropes et des corrélations observées entre ces deux catégories d'effets.

SUMMARY.

L-threonine deaminase and most if not all allosteric systems appear to possess the property of mediating interactions not only between different ligands such as a substrate and an activator or a substrate and an inhibitor, but also interactions between identical ligands including the substrate. Furthermore, these « homotropic effects » are invariably cooperative while interactions between different ligands (heterotropic effects) may be either cooperative or antagonistic.

The interpretation of the homotropic cooperative effects appears particularly challenging and evidently requires rather specific assumptions. The model proposed by MONOD, WYMAN and CHANGEUX [8] is primarily designated as an interpretation of the latter type of effects. The basic feature of the model is the assumption that allosteric proteins able to mediate homotropic interactions are oligomers made up of a limited number of identical subunits associated in such a way as to confer, at least, one axis of rotational symmetry to the molecule. It is further assumed that allosteric oligomers may exist in two conformationally distinct states in both of which however the symmetry of the molecule and therefore also the symmetry of the receptor sites are conserved. Lastly it is assumed that the affinity of receptor sites towards the homologous ligands varies when the protein goes from one state to the other.

On this basis, it turns out to be possible to account not only for homotropic, but also for heterotropic interactions and for the various observed correlations between the two classes of effects.

The two most significant implications of this model are :

1. — That interactions between ligands binding at distinct sites on the same protein molecule may be accounted for even though no direct effect of the binding of one ligand over the inherent dissociation constant of another may be involved. In other words, the interactions are entirely attributed to the existence of two (or more) discrete states for the protein itself.

2. — That globular proteins involving several identical subunits may possess an element of symmetry and should tend to conserve such symmetry in the event that they undergo a conformational alteration.

ZUSAMMENFASSUNG.

Die Untersuchung und der Vergleich der Eigenschaften der L-Threonin-Deaminase mit derjenigen den verschiedenen bekannten Regulationsproteine führen zum Schluss, dass die regulierende Grund-Interaktion, wodurch ein Regulations-Effektor eine Enzymaktivität steuert, nicht durch direkte Interaktionen zwischen Substrat und Effektor zu erklären ist.

Es scheint nun sicher, dass die regulierenden Interaktionen zwischen spezifischen, topographisch verschiedenen Rezeptoren eintreten (allosterische Wirkungen), und durch Konformationsänderungen des Moleküls (allosterische Transition) übermittelt werden.

Bemerkenswert ist, dass die meisten bekannten allosterischen Systemen die Eigenschaft besitzen, die Interaktionen nicht nur zwischen verschiedenen Liganten, wie einem Substrat und einem Aktivator oder einem Substrat und einem Inhibitor, sondern auch zwischen identischen Liganten zu übermitteln. Diese homotropen Wirkungen sind immer kooperativ, während die Interaktionen zwischen verschiedenen Liganten (heterotrope Wirkungen) kooperativ oder antagonistisch sein können.

Die Deutung der homotropen Wirkungen scheint besonders interessant und erfordert spezifische Hypothesen. Ein Modell wurde von MONOD, WYMAN und CHANGEUX [8], um zuerst diese letzte Wirkungsart zu erklären, vorgeschlagen. Die Grundhypothese dieses Modells ist, dass die allosterischen Proteine, die Eigenschaft, homotrope Interaktionen zu übermitteln, dem oligomeren Zustand ihres Moleküls verdanken (das Molekül stammt aus der Assoziation von identischen Untereinheiten in beschränkter Zahl und besitzt wenigstens eine Symmetrie-Achse). Ausserdem wird die Hypothese aufgestellt, dass die allosterischen Oligomere mindestens unter zwei verschiedenen Konformationszuständen bestehen, für welche die Symmetrie des Moleküls und auch diejenige der Rezeptoren beibehalten wird. Endlich wird die Hypothese aufgestellt, dass die Affinität der Rezeptoren für jeden Ligant sich ändert, wenn das Protein von einem zum anderen Zustand übergeht.

Auf dieser Grundlage kann man nicht nur die homotropen sondern auch die heterotropen Interaktionen und die beobachteten Zusammenhänge zwischen diesen beiden Wirkungsarten erklären.

BIBLIOGRAPHIE.

1. DATTA, P., HUGHES, M. et GEST, H. — *Fed. Proc.*, 1963, 22, 476.
2. FREUNDLICH, M. et UMBARGER, H. E. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1963, 28, 505.
3. PATTE, J. C., LE BRAS, G., LOVINY, T. et COHEN, G. N. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1963, 67, 16,

4. COHEN, G. N., PATTE, J. C., TRUFFA-BACHI, P., SAWAS, C. et DOUDOROFF, M. — Colloque International du C.N.R.S. « Mécanismes de régulation des activités cellulaires chez les microorganismes », Marseille, 1963 (sous presse).
 5. GERHART, J. C. et PARDEE, A. B. — *J. Biol. Chem.*, 1962, **237**, 891.
 6. ANTONINI, E., WYMAN, J., MORETTI, R. et ROSSI-FANELLI, A. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1963, **71**, 124.
 7. CHANGEUX, J. P., ULLMANN, A. et MONOD, J. — Colloque International du C.N.R.S., « Mécanismes de régulation des activités cellulaires chez les microorganismes », Marseille, 1963 (sous presse).
 8. MONOD, J., WYMAN, J. et CHANGEUX, J. P. — 1965, à paraître dans *J. Mol. Biol.*
 9. SCHACHMAN, H. K. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1963, **28**, 409.
 10. YANOFSKY, C. — *Bact. Reviews*, 1960, **24**, 221.
 11. AMES, B. N. et HARTMAN, P. E. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1963, **28**, 349.
 12. MARTIN, R. G. — *J. Biol. Chem.*, 1962, **237**, 257.
 13. GERHART, J. C. et PARDEE, A. B. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1963, **28**, 491.
 14. GERHART, J. C. et PARDEE, A. B. — *Fed. Proc.*, 1964, **23**, 727.
 15. CHANGEUX, J. P. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1961, **26**, 313.
 16. WYMAN, J. — *Adv. in Protein Chem.*, 1948, **4**, 407.
 17. WYMAN, J. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1963, **28**, 483.
 18. TRAUT, R. et LIPMANN, F. — *J. Biol. Chem.*, 1963, **238**, 1213.
 19. UMBARGER, H. E. et BROWN, B. — *J. Bacteriol.*, 1955, **70**, 241.
 20. MONOD, J. et JACOB, F. — *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1961, **26**, 389.
 21. ULLMANN, A., VAGELOS, P. R. et MONOD, J. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1964, **17**, 86.
 22. CHANGEUX, J. P. — *Brookhaven Symp.*, 1964, **17**, 232.
-

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

DONNÉES RÉCENTES SUR LA RÉPLICATION
DE L'ADN *IN VIVO*

Vu et approuvé :

Paris, le 3 juillet 1964.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY.

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie
de Paris,

Jean ROCHE.

Printed in France.